

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

Том 98
2021

Ж
М
Э
И

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

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

5
SEPTEMBER – OCTOBER

VOLUME 98
2021

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

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

**ТОМ 98
2021**

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

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

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

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

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

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

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

ПОДПИСКА:

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

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

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

УЧРЕДИТЕЛИ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

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

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

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

Подписано в печать 27.10.2021.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 280 экз.
Усл. печ. л. 6,5.

Отпечатано в «Объединенный
полиграфический комплекс».
115114, Москва, Дербеневская
набережная, 7с2.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместитель главного редактора

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

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

Брусина Е.Б., д.м.н., проф., 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., член-корр. 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. Иванова, 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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

The journal is 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:

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

5

SEPTEMBER – OCTOBER

VOLUME 98

2021

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.](https://www.ebsco.com)

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on October 27, 2021. Print format 60×90^{1/8}. Circulation 250 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 of Epidemiology, 2021

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

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

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

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

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

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

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

Foreign members of the Editorial Board

Shubhada Bopagama, 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, 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 K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Колосовская Е.Н., Кудрявцева Е.Н., Семененко Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., Пшеничная Н.Ю., Каленская А.В., Яцышина С.Б., Шипулина О.Ю., Родионова Е.Н., Петрова Н.С., Соловьева И.В., Квасова О.А., Вершинина М.А., Мамошина М.В., Клушкина В.В., Корабельникова М.И., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Остроушко А.А., Балмасов Е.С., Мосунов А.В. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге*	497
Мионов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Каптелова В.В., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С. Антигенная и генетическая характеристика штаммов <i>Streptococcus pneumoniae</i> , выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования*	512
Игнатъев Г.М., Каа К.В., Антонова Л.П., Отрашевская Е.В., Ишмухаметов А.А. Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β-пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья	519
Катаева Л.В., Вакарина А.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б. Микробиота нижних дыхательных путей при внебольничных пневмониях, в том числе ассоциированных с SARS-CoV-2	528
Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А., Крицкий А.А., Кутырев В.В. Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов <i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы El Tor биовара и их молекулярно-генетический анализ	538
Джайн Е.А., Плеймс Д., Глобенко А.А. Оценка мутагенности, генотоксичности и хронической токсичности имидазолилэтанамида пентандиоовой кислоты в тест-системах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	548
Фролова В.В., Чернов Н.М., Ивкин Д.Ю., Румянцев А.М., Гурина С.В. Определение возможной мишени действия 4,4а-дигидроксантонов в бактериальных клетках	558
ОБЗОРЫ	
Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19.	567
Стовба Л.Ф., Кротков В.Т., Мельников С.А., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В. Применение штамма MVA вируса вакцины для создания рекомбинантных векторных вакцин против актуальных арбовирусных инфекций*	579
Gill G. Epidemiologic characteristics of <i>Campylobacter</i> infections in high-income countries: a systematic review	588
ЮБИЛЕИ	
Белов А.Б., Кузин А.А., Зобов А.Е. Академик В.Д. Беляков — творец современной отечественной теории эпидемиологической науки: к столетию со дня рождения выдающегося учёного, педагога и военного эпидемиолога	597
РЕЦЕНЗИИ	
Рецензия на учебник академика РАН Р.М. Хаитова «Иммунология»	607

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Akimkin V.G., Kuzin S.N., Kolosovskaya E.N., Kudryavtceva E.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., Pshenichnaya N.Yu., Kalenskaya A.V., Yatchishina S.B., Shipulina O.Yu., Rodionova E.N., Petrova N.S., Solov'eva I.V., Kvasova O.A., Vershinina M.A., Mamoshina M.V., Klushkina V.V., Korabel'nikova M.I., Churilova N.S., Panasyuk Ya.V., Vlasenko N.V., Ostroushko A.A., Balmasov E.S., Mosunov A.V. Assessment of the COVID-19 epidemiological situation in St. Petersburg*	497
Mironov K.O., Gaponova I.I., Korchagin V.I., Mihailova Y.V., Shelenkov A.A., Kaptelova V.V., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S. Antigenic and genetic characterization of <i>Streptococcus pneumoniae</i> strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections by using high-throughput sequencing*	512
Ignatyev G.M., Kaa K.V., Antonova L.P., Atrasheuskaya A.V., Ishmukhametov A.A. Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by beta-propiolactone	519
Kataeva L.V., Vakarina A.A., Stepanova T.F., Stepanova K.B. Microbiota of the lower respiratory tract in community-acquired pneumonia, including cases associated with SARS-CoV-2	528
Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Plekhanov N.A., Kritsky A.A., Kutyrev V.V. Identification of <i>Vibrio cholerae</i> O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B and their molecular genetic analysis	538
Jain E.A., Pleimes D., Globenko A.A. Evaluation of mutagenicity, genotoxicity and chronic toxicity of antiviral drug imidazolyl ethanamide pentandioic acid in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> test systems	548
Frolova V.V., Chernov N.M., Ivkin D.Yu., Rummyantsev A.M., Gurina S.V. Identifying possible target of action of 4,4a-dihydroxanthones in bacterial cells	558
REVIEWS	
Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. The role of plasma serine leukocyte proteinase inhibitor in the body's defense against COVID-19	567
Stovba L.F., Krotkov V.T., Melnikov S.A., Paveliev D.I., Chernikova N.K., Borisevich S.V. Using the vaccinia virus MVA strain for developing recombinant vector vaccines against current arboviral infections*	579
Gill G. Epidemiologic characteristics of <i>Campylobacter</i> infections in high-income countries: a systematic review	588
ANNIVERSARIES	
Belov A.B., Kuzin A.A., Zobov A.E. Academician V.D. Belyakov is the creator of the modern domestic theory of epidemiological science: on the centenary of the birth of an outstanding scientist, teacher and military epidemiologist.....	597
BOOK REVIEW	
Review of the textbook of the academician of the Russian Academy of Sciences R.M. Khaitov "Immunology"	607

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-154>



Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге

Акимкин В.Г.¹, Кузин С.Н.^{1✉}, Колосовская Е.Н.¹, Кудрявцева Е.Н.¹, Семененко Т.А.², Плоскирева А.А.¹, Дубоделов Д.В.¹, Тиванова Е.В.¹, Пшеничная Н.Ю.¹, Каленская А.В.¹, Яцышина С.Б.¹, Шипулина О.Ю.¹, Родионова Е.Н.¹, Петрова Н.С.¹, Соловьева И.В.¹, Квасова О.А.¹, Вершинина М.А.¹, Мамошина М.В.¹, Клушкина В.В.¹, Корабельникова М.И.¹, Чурилова Н.С.¹, Панасюк Я.В.¹, Власенко Н.В.¹, Остроушко А.А.¹, Балмасов Е.С.¹, Мосунов А.В.¹

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

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Цель. Определить эпидемиологические закономерности распространения SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга за годовой период пандемии COVID-19.

Материалы и методы. Проведён анализ динамики случаев заболеваний COVID-19 в Санкт-Петербурге в период с 02.03.2020 по 04.04.2021 и гендерно-возрастной характеристики пациентов. Информация о пациенте (возраст, пол, форма заболевания, госпитализация, социально-профессиональная принадлежность) извлечена из базы данных, сформированной на основе материалов формы статистического учёта № 058/у.

Результаты. По прошествии года в динамике выявления случаев COVID-19 в Санкт-Петербурге можно выделить два цикла сезонного подъёма заболеваемости (весенний и осенне-зимний) и 8 периодов эпидемии. Установлено, что в структуре заболевших COVID-19 отсутствует гендерно-возрастная избирательность, о чём свидетельствуют относительно равномерные показатели заболеваемости мужчин и женщин на 100 тыс. населения в каждой возрастной группе в отдельные периоды эпидемии. Отчётливо выражена зависимость клинических проявлений COVID-19 от возраста пациентов: тяжёлые формы заболевания чаще диагностированы у пациентов старше 70 лет независимо от гендерной принадлежности. Наиболее вовлечёнными в эпидемический процесс COVID-19 по социально-профессиональному статусу были пенсионеры и лица, связанные по роду деятельности с обеспечением жизнедеятельности Санкт-Петербурга. Удельный вес пенсионеров среди заболевших COVID-19 составил 13,69% (мужчины) и 17,67% (женщины). Доля медицинских работников составила 3,67% (мужчины) и 9,41% (женщины).

Заключение. Высказано предположение, что COVID-19 формируется как сезонное заболевание с ежегодными осенне-зимними эпидемическими циклами. Обсуждаются перспективы вакцинопрофилактики COVID-19 в России и необходимость учёта в системе эпидемиологического надзора за COVID-19 случаев осложнений, патогенетически связанных с острой фазой заболевания

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, заболеваемость, эпидемический процесс, эпидемиологические закономерности, гендерно-возрастная пропорция, Санкт-Петербург

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., Кузин С.Н., Колосовская Е.Н., Кудрявцева Е.Н., Семененко Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., Пшеничная Н.Ю., Каленская А.В., Яцышина С.Б., Шипулина О.Ю., Родионова Е.Н., Петрова Н.С., Соловьева И.В., Квасова О.А., Вершинина М.А., Мамошина М.В., Клушкина В.В., Корабельникова М.И., Чурилова Н.С., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Остроушко А.А., Балмасов Е.С., Мосунов А.В. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):497–511.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-154>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-154>

Assessment of the COVID-19 epidemiological situation in St. Petersburg

Vasily G. Akimkin¹, Stanislav N. Kuzin^{1✉}, Elena N. Kolosovskaya¹, Elena N. Kudryavtceva¹, Tatyana A. Semenenko², Antonina A. Ploskireva¹, Dmitry V. Dubodelov¹, Elena V. Tivanova¹, Natalia Yu. Pshenichnaya¹, Anna V. Kalenskaya¹, Svetlana B. Yatchishina¹, Olga Yu. Shipulina¹, Elena N. Rodionova¹, Natalia S. Petrova¹, Irina V. Solov'eva¹, Olga A. Kvasova¹, Marina A. Vershinina¹, Marina V. Mamoshina¹, Vitalina V. Klushkina¹, Marina I. Korabel'nikova¹, Nadezhda S. Churilova¹, Yarina V. Panasyuk¹, Natalia V. Vlasenko¹, Alexey A. Ostroushko¹, Evgeniy S. Balmasov¹, Artem V. Mosunov¹

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;

²National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Aim. Identification of epidemiological patterns of the SARS-CoV-2 spread among the population of St. Petersburg during the one-year COVID-19 pandemic period.

Materials and methods. The performed analysis focused on the dynamics of COVID-19 cases in St. Petersburg from 2/3/2020 to 4/4/2021 and on the gender-age profile of patients. The information about patients (age, gender, type of the disease, hospitalization, social, and occupational status) was obtained from the database containing the materials from statistical data form No. 058/u.

Results. After one year, the dynamics of reported cases of COVID-19 in St. Petersburg shows two cycles of seasonal surge (spring and autumn-winter) and 8 epidemic periods. It has been found that there are no gender-age differences among COVID-19 patients, which can be seen from the relatively similar number of cases among men and women per 100,000 people in each age group during specific epidemic periods. The strong association between clinical manifestations of COVID-19 and the patients' age was detected: Severe cases were more frequently diagnosed in patients over 70 years, regardless of their gender identity. Based on the social and occupational status, the people who were most exposed to the COVID-19 epidemic process were retirees and people whose occupation was associated with health and safety of St. Petersburg. Among the COVID-19 patients, retirees accounted for 13.69% (men) and 17.67% (women). The proportion of healthcare workers was 3.67% (men) and 9.41% (women).

Conclusion. It has been assumed that COVID-19 tends to be a seasonal disease featuring annual autumn-winter epidemic cycles. The study addressed prospects of preventive vaccination against COVID-19 in Russia and the importance of tracking the complications pathogenetically associated with the acute phase of the disease in the system of epidemiological surveillance.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, incidence, epidemic process, epidemiological patterns, gender-age proportion, St. Petersburg

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., Kuzin S.N., Kolosovskaya E.N., Kudryavtceva E.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., Pshenichnaya N.Yu., Kalenskaya A.V., Yatchishina S.B., Shipulina O.Yu., Rodionova E.N., Petrova N.S., Solov'eva I.V., Kvasova O.A., Vershinina M.A., Mamoshina M.V., Klushkina V.V., Korabel'nikova M.I., Churilova N.S., Panasyuk Ya.V., Vlasenko N.V., Ostroushko A.A., Balmasov E.S., Mosunov A.V. Assessment of the COVID-19 epidemiological situation in St. Petersburg. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, épidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):497–511.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-154>

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная β -корона-вирусом, получившим название SARS-CoV-2, по-прежнему остаётся серьёзным вызовом XXI в., и многочисленные проблемы, связанные с ним, только нарастают. На 04.04.2021 в мире зарегистрировано в общей сложности 131 млн случаев

COVID-19, из которых 2,84 млн завершились летальным исходом. В странах Европы сезонный подъем заболеваемости COVID-19, который ещё называют «второй волной», оказался весьма мощным, что вынудило многие правительства ужесточить противоэпидемические мероприятия или даже закрыть границы. К числу особенностей се-

зонного подъёма следует отнести не только его высокую интенсивность, но и то, что в этот период у пациентов многих стран стали определять новые варианты SARS-CoV-2. В начале 2021 г. большое внимание специалистов привлёк генетический вариант SARS-CoV2, обозначенный как «британский». От дикого варианта вируса его отличают 2 замены и 2 делеции нуклеотидов: N501Y, A570D, del HV 69-70, del Y144 [1–4]. Кроме того, появились сообщения о распространении в странах Европы ещё одного варианта генных мутаций SARS-CoV-2, обозначенного как южноафриканский [5–8], который, по мнению некоторых исследователей, может «ускользнуть» от иммунитета, индуцированного применяемыми вакцинами.

На фоне тяжёлой эпидемиологической ситуации с начала 2021 г. во многих странах мира, включая Россию, начата иммунизация населения против COVID-19, целью которой является формирование популяционного иммунитета к SARS-CoV-2. Вместе с тем остаётся весьма актуальным дальнейшее изучение особенностей эпидемического процесса COVID-19, что позволит определить основные принципы эпидемиологического надзора за этим заболеванием и, возможно, разработать меры, позволяющие эффективно влиять на интенсивность распространения SARS-CoV-2.

Установлены наиболее общие характеристики эпидемического процесса COVID-19 в России. На начальном этапе эпидемии (конец февраля — начало марта 2020 г.) проникновение SARS-CoV-2 осуществлялось через основные транспортные узлы страны — Москву и Санкт-Петербург. Особенность того периода заключалась в том, что в европейских странах эпидемия COVID-19 уже достигла высокой интенсивности, тогда как в России ещё не началась. Возвращаясь из командировок и туристических поездок, инфицированные люди послужили триггером эпидемического процесса COVID-19, в первую очередь в Москве и Санкт-Петербурге. Изучение распространения SARS-CoV-2 в начале эпидемии в Москве позволило выявить некоторые наиболее общие закономерности: вирус не обладает гендерно-возрастной избирательностью и в равной степени способен заражать всех людей; наиболее тяжело болеют люди в возрасте старше 70 лет; значительное количество людей переносят COVID-19 в бессимптомной форме [9, 10].

Начавшийся в России в конце сентября 2020 г. сезонный подъём заболеваемости COVID-19 оказался гораздо более значительным и продолжительным, чем весенний. Его особенностью явилось то, что наиболее вовлечёнными в эпидемический процесс COVID-19 оказались субъекты РФ, тогда как весной основную массу случаев заболевания регистрировали в Москве. Важным и актуальным представляется изучение эпидемиологических законо-

мерностей распространения SARS-CoV-2 во втором по величине городе России — Санкт-Петербурге.

Цель работы: изучить закономерности распространения SARS-CoV-2 и эпидемиологические особенности пандемии COVID-19 в Санкт-Петербурге за период с 02.03.2020 по 04.04.2021.

Материалы и методы

Исследование выполнено в ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Проведён анализ заболеваемости COVID-19 с 02.03.2020 по 04.04.2021 в Санкт-Петербурге. Информация о пациентах (возраст, пол, форма заболевания) извлечена из базы данных, сформированной на основе материалов формы статистического учёта № 058/у «Экстренное извещение об инфекционном, паразитарном и другом заболевании, профессиональном отравлении, неблагоприятной реакции, связанной с иммунизацией, воздействии живых механических сил». С использованием указанных материалов изучены основные проявления эпидемического процесса COVID-19, включавшие следующие характеристики: динамика заболеваемости, гендерная пропорция и возрастная структура заболевших, удельный вес госпитализированных пациентов, соотношение различных форм инфекции, социальный и профессиональный статус заболевших.

Материалы для проведения анализа возрастнo-половой структуры населения получены с использованием «Витрины статистических данных» Федеральной службы государственной статистики. В исследования были включены пациенты с COVID-19, распределённые на следующие группы: 0–18 лет ($n = 30\ 928$; мужчины/женщины 15 821/15 107), 19–29 лет ($n = 39\ 405$; мужчины/женщины 17 337/22 068), 30–49 лет ($n = 116\ 674$; мужчины/женщины 51 631/65 043), 50–69 лет ($n = 87\ 579$; мужчины/женщины 33 958/53 621), 70–79 лет ($n = 18\ 501$; мужчины/женщины 6967/11 534), 80 лет и старше ($n = 12\ 014$; мужчины/женщины 3714/8300).

Удельный вес госпитализированных и не госпитализированных пациентов в отдельные периоды пандемии и в различных возрастных группах пациентов с COVID-19 определяли на когорте пациентов ($n = 307\ 104$; мужчины/женщины 130 262/176 842).

Для статистической обработки использованы стандартные методы описательной статистики «Microsoft Excel» и «Statistica 12.0» («StatSoft»). Средние значения оценивали с учётом 95% доверительного интервала (95% ДИ) по методу Клоппера–Пирсона (точный метод).

Результаты

Динамика регистрации новых случаев COVID-19 в Санкт-Петербурге за период с 02.03.2020 по 04.04.2021 представлена на **рис. 1**.

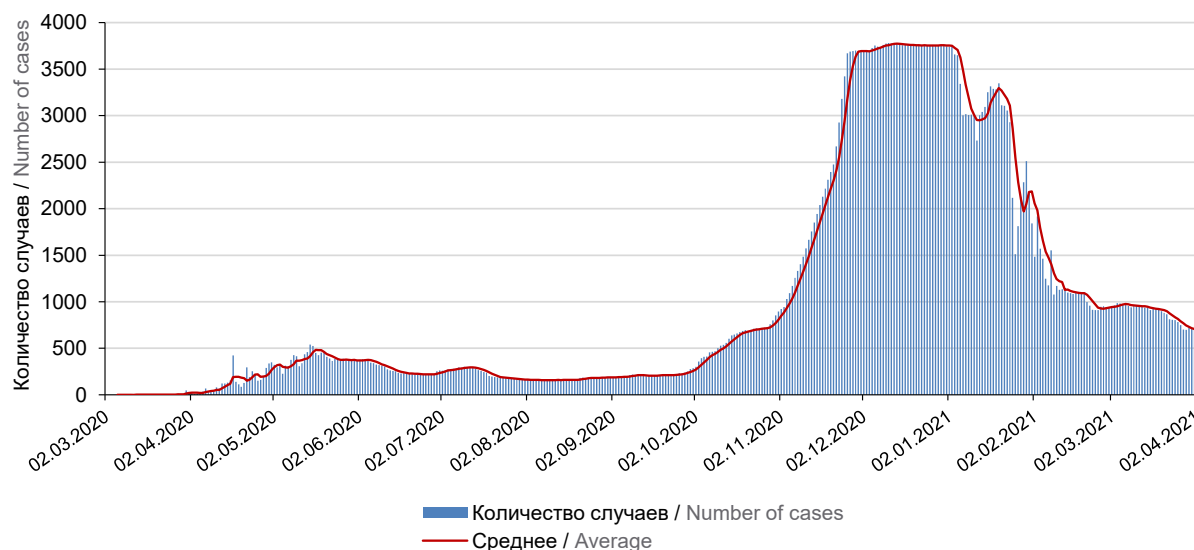


Рис. 1. Динамика регистрации новых случаев (абс.) среди населения Санкт-Петербурга.

Fig. 1. The dynamics of reported new cases (abs.) among the population of St. Petersburg.

По характеру кривой выявления новых случаев COVID-19 можно выделить несколько периодов в эволюции эпидемии в Санкт-Петербурге.

В первый период (02.03–31.03.2020), который можно обозначить как период «завоза», случаи новой коронавирусной инфекции регистрировали, как правило, среди прибывших из-за рубежа и у контактных с ними лиц. В основную популяцию SARS-CoV-2 ещё не вышел, регистрировали единичные, не связанные между собой случаи COVID-19. За 30 дней этого периода в Санкт-Петербурге было выявлено всего 98 заболевших.

С 01.04.2020 зарегистрировано постоянно нарастающее число новых случаев COVID-19, что можно расценивать как старт эпидемического процесса в Санкт-Петербурге. Период эпидемического роста продолжался 45 дней (01.04.2020–16.05.2020) и характеризовался умеренным приростом числа новых случаев заболевания в день (+4,6%). В этот период число выявленных случаев COVID-19 в Санкт-Петербурге выросло с 27 (01.04.2020) до 525 (16.05.2020). Следует отметить, что стабилизации на максимальных значениях числа новых случаев COVID-19 в этот период не было, и со следующего дня зафиксировано постепенное снижение величины этого показателя, т.е. период роста сменился продолжительным периодом медленного снижения с последующей стабилизацией на минимальных значениях. В период снижения, продолжавшийся 76 дней (с 17.05.2020 по 31.07.2020), число новых случаев COVID-19 за день сократилось до 159. Тенденция динамики регистрации COVID-19 характеризовалась умеренным снижением с темпом $-1,1\%$ в день. Среднее число случаев COVID-19 за периоды роста и снижения, рассчитанного без

учёта данных периода «завоза», составило 255 в день.

Период эпидемического затишья (с 01.08.2020 по 27.09.2020) продлился 57 дней, в течение которых регистрировали минимальное количество случаев COVID-19 в день — от 155 (08.08.2020) до 232 (26.09.2020). Эпидемиологическая ситуация в этот период оставалась стабильной (темп роста $+0,7\%$ в день). Среднее количество ежедневно регистрируемых случаев COVID-19 в день составило 189,4.

Осложнение эпидемиологической ситуации с COVID-19 в Санкт-Петербурге, связанное с активизацией сезонных факторов и окончанием сезона отпусков, началось 28.09.2020. С этого дня стартовал сезонный рост заболеваемости COVID-19, который продолжался 62 дня до 29.11.2020. Минимум/максимум числа случаев COVID-19 в этот период составляло 227/3701 (27.09.2020)/(29.11.2020). По интенсивности нарастания числа случаев COVID-19 в период сезонного подъёма можно выделить 2 интервала: с 28.09.2020 по 03.11.2020 и с 04.11.2020 по 29.11.2020. В первом темп нарастания анализируемого показателя составлял $+3,0\%$ в день, во втором — $+4,8\%$. С учётом эффекта высокой базы такую интенсивность нарастания случаев COVID-19 следует признать весьма существенной.

В следующий период пандемии (30.11.2020–05.01.2021), который можно определить как период эпидемического максимума (плато), число ежедневно выявляемых пациентов с COVID-19 оставалось стабильным (темп роста $+0,018\%$ в день), варьируя от 3649 до 3779 случаев в день.

Начиная с 06.01.2021 по 08.02.2021 число ежедневно выявляемых случаев COVID-19 начало уменьшаться с умеренным темпом $-2,8\%$ в день.

В этот период имели место 2 коротких интервала (16.01.2021–20.01.2021 и 27.01.2021–31.01.2021), во время которых зарегистрировано увеличение числа случаев COVID-19.

Заключительный период (09.02.2021–04.04.2021), обозначенный как период эпидемической стабильности, характеризовался постоянством количества ежедневно выявляемых новых случаев COVID-19, которое варьировало от 697 до 1169 с темпом роста +0,78% в день. Среднее число случаев COVID-19 в день в этот период составило 1001,7.

Общая гендерная пропорция заболевших COVID-19 в г. Санкт-Петербурге за весь период наблюдения характеризуется преобладанием женщин (57,6%), что, по нашему мнению, обусловлено современной структурой населения Санкт-Петербурга. Она же предопределила соотношение мужчины/женщины среди заболевших COVID-19 в Санкт-Петербурге в различных возрастных группах (рис. 2).

В гендерно-возрастной структуре заболевших COVID-19 в Санкт-Петербурге отчётливо выражено преобладание пациентов в возрасте 30–49 и 50–69 лет. Так, в когорте мужчин с COVID-19 доля лиц этих возрастных групп составляла 39,89% (95% ДИ 39,63–40,16) и 26,24% (95% ДИ 26,00–26,48), в когорте женщин с COVID-19 — 37,03% (95% ДИ 36,80–37,25) и 30,52% (95% ДИ 30,31–30,74). Остальные возрастные группы пациентов с COVID-19 имели значительно меньший удельный вес. Доля детей до 18 лет с COVID-19 составляла 12,22% (95% ДИ 12,05–12,40) мальчиков и 8,60% (95% ДИ 8,47–8,73) девочек. Пациенты 70–79 и старше 80 лет имели наименьший удельный вес в возрастной структуре всей когорты заболевших. В когорте мужчин с COVID-19 доля пациентов этих возрастных групп составила 5,38% (95% ДИ 5,26–5,51) и 2,87% (95%

ДИ 2,78–2,96), в когорте женщин — 6,57% (95% ДИ 6,45–6,68) и 4,72% (95% ДИ 4,63–4,82). Следует отметить, что среди лиц, заболевших COVID-19 до 50 лет, доля мужчин была несколько выше в каждой возрастной группе, тогда как среди пациентов старше 50 лет преобладали женщины.

Уровень заболеваемости COVID-19 в пересчёте на 100 тыс. каждой возрастной группы значительно различался. Закономерности, присущие когортам мужчин и женщин с COVID-19, представлены в табл. 1.

Как следует из данных, представленных в табл. 1, среди мужчин отчётливо прослеживается увеличение уровня заболеваемости COVID-19 от младших к старшим возрастным группам с некоторым снижением показателя в группах 70–79 и старше 80 лет.

Наименьшее значение показателя зафиксировано у детей в возрастной группе до 18 лет — 3109,6⁰/₀₀₀₀. Следует отметить значительный разброс в уровнях заболеваемости у детей в зависимости от возраста — от 1475,6⁰/₀₀₀₀ (2 года) до 6684,8⁰/₀₀₀₀ (17 лет). Наиболее высокий уровень заболеваемости у мужчин отмечен в возрастных группах 30–49 и 50–69 лет, составивший 5979,1 и 6071,8⁰/₀₀₀₀ соответственно. Максимальные значения показателя заболеваемости COVID-19 выявлены у мужчин в возрасте 29, 60 и 71 года — 7401,6, 7053,8 и 8008,6⁰/₀₀₀₀ соответственно.

Закономерности возрастной структуры заболеваемости COVID-19 в когорте женщин соответствовали подобной тенденции, но с максимальным уровнем заболеваемости COVID-19 в возрастной группе 30–49 лет — 7137,7⁰/₀₀₀₀. Заболеваемость среди лиц в возрасте 70–79 и старше 80 лет была несколько ниже, чем у мужчин, и составила 4804,3 и 4285,0⁰/₀₀₀₀ соответственно. В отличие от муж-

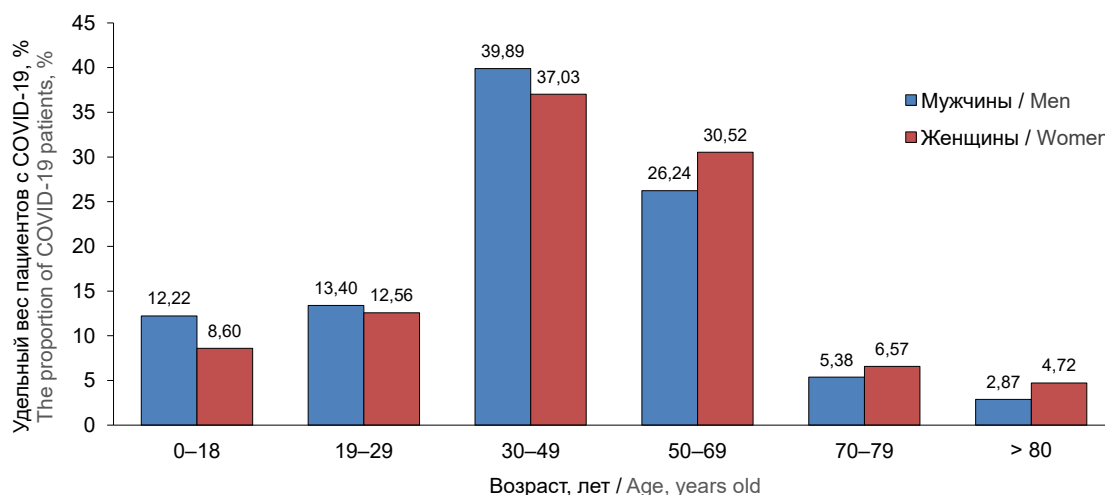


Рис. 2. Возрастная структура заболевших (мужчин и женщин) в период эпидемии COVID-19 в г. Санкт-Петербурге.

Fig. 2. The age distribution (men and women) during the COVID-19 epidemic in St. Petersburg.

Таблица 1. Заболеваемость COVID-19 в Санкт-Петербурге в различных возрастных группах населения (мужчины/женщины) (показатель на 100 тыс. населения возрастной группы, ‰)**Table 1.** COVID-19 incidence in different age groups of population (men/women) in St. Petersburg (cases per 100,000 people of the age group, ‰)

Возраст, лет Age, years	Заболеваемость в возрастной группе Incidence in age groups	Минимальный показатель Minimum rate		Максимальный показатель Maximum rate		Стандартное отклонение Standard deviation
		‰	возраст, лет age, years old	‰	возраст, лет age, years old	
Мужчины / Men						
0–18	3109,6	1475,6	2	6684,8	17	1703,4
19–29	5385,3	3686,6	19	7401,6	29	1282,7
30–49	5979,1	5016,6	49	6585,8	33	381,6
50–69	6071,8	5252,8	69	7053,8	60	369,5
70–79	5813,4	3620,8	77	8008,6	71	1418,9
> 80	5330,2	219,5	≥ 100	6851,9	82	1796,4
Женщины / Women						
0–18	3126,4	1246,6	3	6711,5	17	1830,6
19–29	6655,7	4111,6	19	9507,6	29	1777,8
30–49	7137,7	5788,4	47	7762,6	33	513,0
50–69	6742,9	5372,9	69	7911,5	59	754,3
70–79	4804,3	2992,5	77	6268,9	71	1074,8
> 80	4285,0	430,4	≥ 100	6194,4	81	1260,0

чин, наиболее высокий показатель заболеваемости COVID-19 зафиксирован у женщин в возрасте 29 и 59 лет — 9507,6 и 7911,5‰ соответственно.

Одним из основных параметров, по которым проводится оценка тяжести эпидемиологической ситуации, является соотношение удельного веса различных форм COVID-19. Во все периоды эпидемии преобладали бессимптомная и лёгкая формы COVID-19 как у мужчин, так и у женщин. Их суммарный удельный вес (кроме периода «завоза») в пересчёте за весь период наблюдения составлял у мужчин 83,77% (95% ДИ 83,51–84,02) и женщин 83,95% (95% ДИ 83,72–84,16). При этом лёгкая форма COVID-19 преобладала как у мужчин, так и у женщин, составляя от общего числа заболевших 66,26% (95% ДИ 65,93–66,58) и 68,66% (95% ДИ 68,39–68,93) соответственно.

Максимальные значения суммарного удельного веса бессимптомных и лёгких форм COVID-19 выявлены в период эпидемиологического максимума (30.11.2020–05.01.2021): у мужчин — 86,64% (95% ДИ 86,35–86,93), у женщин — 88,08% (87,84–88,31). В остальные периоды суммарная доля этих форм была несколько ниже. Минимальный удельный вес отмечен в период снижения (17.05–31.07.2020): 55,29% (95% ДИ 56,60–59,30) — у мужчин и 55,29% (95% ДИ 53,80–56,77) — у женщин. Следует отметить общее преобладание лёгкой формы заболевания среди пациентов с COVID-19 в Санкт-Петербурге независимо от гендерной принадлежности.

В табл. 2 представлены данные о структуре COVID-19 по тяжести течения заболевания и доли госпитализированных лиц в разные периоды эпидемии в Санкт-Петербурге.

Следует отметить, что по мере развития эпидемии в Санкт-Петербурге удельный вес пациентов с COVID-19 в лёгкой форме — как мужчин, так и женщин — увеличивался. В период эпидемического подъёма (01.04.2020–16.05.2020) доля пациентов с лёгкой формой COVID-19 составляла 39,08% (95% ДИ 37,92–40,25) — у мужчин и 46,06% (95% ДИ 44,89–47,27) — у женщин. На пике сезонного подъёма (30.11.2020–05.01.2021) доля таких пациентов существенно выросла, достигнув 71,36% (70,97–71,75) — у мужчин и 73,92% (73,61–74,24) — у женщин. В заключительные два периода (снижения и эпидемической стабильности) удельный вес пациентов с лёгким течением COVID-19 ещё увеличился и составил у мужчин 73,60% (73,06–74,14) и 73,24% (72,37–74,09) и у женщин 76,26% (75,82–76,70) и 75,29% (74,59–75,98) соответственно.

Удельный вес пациентов с тяжёлым течением заболевания в разные периоды эпидемии также существенно различался, причём в начале эпидемии тяжёлые формы COVID-19 регистрировали существенно чаще. Максимальный удельный вес тяжёлых форм COVID-19 имел место в периоды эпидемического снижения (17.05.2020–31.07.2020) и затихья (01.08.2020–27.09.2020) — у мужчин 16,28% (15,20–17,41) и 15,17% (13,84–16,57) и у женщин — 13,72% (12,79–14,68) и 13,85% (12,74–

Таблица 2. Структура COVID-19 по тяжести состояния пациентов и удельный вес госпитализированных пациентов в разные периоды эпидемии в Санкт-Петербурге (в %)

Table 2. The COVID-19 breakdown by the severity of the disease and the proportion of hospitalized patients during different epidemic periods in St. Petersburg (%)

Периоды эпидемии Epidemic periods		Тяжесть течения COVID-19 / Severity of COVID-19				Доля госпитализированных Proportion of hospitalized patients
		бессимптомная asymptomatic form	лёгкая mild form	среднетяжёлая moderate form	тяжёлая severe form	
Мужчины / Men						
Период «завоза» "Importation" period	02.03.2020– 30.03.2020	5,23% (2,95–8,47)	25,09% (20,18–30,52)	53,66% (47,70–59,54)	16,03% (11,98–20,79)	87,11% (82,67–90,76)
Период эпидемического подъёма Period of epidemic upswing	01.04.2020– 16.05.2020	33,63% (32,51–34,76)	39,08% (37,92–40,25)	21,51% (20,54–22,50)	5,78% (5,24–6,36)	29,21% (28,15–30,29)
Период эпидемического снижения Period of epidemic decline	17.05.2020– 31.07.2020	7,41% (6,65–8,22)	47,88% (46,39–49,37)	28,43% (27,10–29,80)	16,28% (15,20–17,41)	45,39% (43,97–46,82)
Эпидемическое «затишье» Epidemic slowdown	01.08.2020– 27.09.2020	20,10% (18,61–21,66)	50,29% (48,40–52,19)	14,43% (13,13–15,81)	15,17% (13,84–16,57)	27,40% (26,19–28,64)
Сезонный рост Seasonal surge	28.09.2020– 29.11.2020	19,24% (18,48–20,01)	60,22% (59,27–61,17)	17,82% (17,08–18,57)	2,72% (2,41–3,05)	9,85% (9,52–10,18)
Эпидемический максимум Epidemic maximum	30.11.2020– 05.01.2021	15,28% (14,98–15,59)	71,36% (70,97–71,75)	12,90% (12,61–13,19)	0,46% (0,41–0,53)	13,50% (12,56–14,49))
Период снижения Period of decline	06.01.2021– 08.02.2021	12,65% (12,24–13,06)	73,60% (73,06–74,14)	12,48% (12,07–12,89)	1,27% (1,14–1,42)	6,83% (6,22–7,48)
Период эпидемической стабильности Period of epidemic stability	09.02.2020– 04.04.2021	12,10% (11,48–12,74)	73,24% (72,37–74,09)	14,63% (13,96–15,33)	0,03% (0,01–0,08)	10,54% (8,56–12,79)
Женщины / Women						
Период «завоза» "Importation" period	02.03.2020– 30.03.2020	13,47% (9,80–17,89)	24,92% (20,10–30,24)	48,82% (43,00–54,66)	12,79% (9,22–17,14)	83,84% (79,15–87,84)
Период эпидемического подъёма Period of epidemic upswing	01.04.2020– 16.05.2020	22,66% (21,67–23,69)	46,06% (44,86–47,27)	25,51% (24,47–26,57)	5,76% (5,22–6,35)	32,24% (31,14–33,35)
Период эпидемического снижения Period of epidemic decline	17.05.2020– 31.07.2020	7,92% (7,20–8,69)	49,65% (48,28–51,01)	28,72% (27,49–29,97)	13,72% (12,79–14,68)	42,84% (41,56–44,13)
Эпидемическое «затишье» Epidemic slowdown	01.08.2020– 27.09.2020	21,01% (19,69–22,38)	50,67% (49,02–52,32)	14,46% (13,33–15,66)	13,85% (12,74–15,03)	24,17% (23,18–25,18)
Сезонный рост Seasonal surge	28.09.2020– 29.11.2020	18,28% (17,66–18,91)	61,96% (61,17–62,74)	17,71% (17,09–18,33)	2,06% (1,83–2,30)	9,09% (8,81–9,36)
Эпидемический максимум Epidemic maximum	30.11.2020– 05.01.2021	14,15% (13,90–14,40)	73,92% (73,61–74,24)	11,59% (11,36–11,82)	0,34% (0,30–0,38)	13,15% (12,30–14,03)
Период снижения Period of decline	06.01.2021– 08.02.2021	11,66% (11,33–12,00)	76,26% (75,82–76,70)	11,22% (10,89–11,55)	0,86% (0,77–0,96)	6,93% (6,42–7,47)
Период эпидемической стабильности Period of epidemic stability	09.02.2020– 04.04.2021	11,17% (10,67–11,69)	75,29% (74,59–75,98)	13,51% (12,97–14,07)	0,03% (0,01–0,07)	8,36% (6,82–10,11)

15,03) соответственно. В периоды эпидемического максимума, снижения и эпидемической стабильности доля пациентов с тяжёлым течением COVID-19 существенно снизилась, составив 0,03–1,27% у мужчин и 0,03–0,86% у женщин.

Отчётливо выражены изменения в удельном весе госпитализированных пациентов с COVID-19 на разных этапах эпидемии, что связано, в первую оче-

редь, с адаптацией медицинской службы Санкт-Петербурга к новым условиям работы в период пандемии. В начале эпидемии COVID-19 при отсутствии опыта ведения таких больных, общем напряжённом медийном фоне, госпитализировали максимально возможное количество пациентов: у мужчин доля госпитализированных составила 87,11% (95% ДИ 82,67–90,76) и у женщин — 83,84% (95% ДИ

79,15–87,84). С самого начала эпидемии Правительством РФ была принята стратегия борьбы с новым заболеванием, согласно которой приоритет отдавался максимально возможному сохранению здоровья людей и минимизации числа летальных исходов. Интенсивные исследования, проводимые в мире и в России, позволили оптимизировать тактику ведения больных с COVID-19, научно обосновать возможность и целесообразность лечения пациентов с лёгкими и среднетяжёлыми формами заболевания в домашних условиях под контролем врачей. В результате в период сезонного подъёма (28.09.2020–29.11.2020) и эпидемического максимума (30.11.2020–05.01.2021) стало возможным существенно снизить долю госпитализированных пациентов. В эти периоды она составляла у мужчин 9,85% (9,52–10,18) и 13,50% (12,56–14,49) и у женщин 9,09% (8,81–9,36) и 13,15% (12,30–14,03) от всех выявленных случаев COVID-19 в эти периоды эпидемии соответственно.

Анализ удельного веса форм COVID-19 различной степени тяжести в отдельных возрастных

группах показал, что у пациентов старше 70 лет, независимо от гендерной принадлежности, частота среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19 существенно выше, чем у более молодых пациентов (табл. 3).

В возрастных группах 0–18 и 19–29 лет тяжёлое течение COVID-19 зарегистрировано с минимальной частотой — у мужчин 0,01% (0,00–0,06) и 0,14% (0,08–0,23), у женщин — 0,01% (0,00–0,06) и 0,05% (0,02–0,11%) соответственно. В когорте мужчин резкое увеличение удельного веса пациентов с тяжёлым течением COVID-19 до 13,60% (95% ДИ 13,16–14,06) зафиксировано в возрастной группе 50–69 лет. В возрастных группах 70–79 и старше 80 лет пациенты с тяжёлым течением COVID-19 составляли 10,94% (10,08–11,86) и 23,60% (22,00–25,25) соответственно.

В когорте женщин с COVID-19 до 50 лет удельный вес пациенток с тяжёлым течением заболевания был невелик и в возрастной группе 30–49 лет составил 0,25% (95% ДИ 0,20–0,30). В отличие от мужчин среди женщин 50–69 лет с COVID-19 тя-

Таблица 3. Удельный вес различных форм COVID-19 у пациентов отдельных возрастных групп в Санкт-Петербурге (в %) **Table 3.** Proportions of different COVID-19 cases in the age groups of patients in St. Petersburg (%)

Возраст, лет Age, years	Тяжесть течения COVID-19 / Severity of COVID-19				Доля госпитализированных Proportion of hospitalized patients
	бессимптомная asymptomatic form	лёгкая mild form	среднетяжёлая moderate form	тяжёлая severe form	
Мужчины / Men					
0–18	25,29 (24,39–26,20)	69,05 (68,08–70,01)	5,65 (5,18–6,15)	0,01 (0,00–0,06)	8,85 (8,26–9,46)
19–29	22,31 (21,54–23,14)	71,11 (70,25–71,95)	6,44 (5,99–6,92)	0,14 (0,08–0,23)	8,83 (8,26–9,43)
30–49	17,43 (17,02–17,85)	70,46 (69,96–70,95)	11,54 (11,20–11,89)	0,57 (0,49–0,65)	14,58 (14,16–15,01)
50–69	13,60 (13,16–14,06)	60,41 (59,76–61,04)	22,75 (22,21–23,31)	13,60 (13,16–14,06)	34,91 (34,22–35,60)
70–79	10,55 (9,70–11,45)	46,42 (45,00–47,84)	32,09 (30,77–33,43)	10,94 (10,08–11,86)	56,91 (55,45–58,45)
> 80	8,36 (7,36–9,47)	33,48 (31,70–35,30)	34,56 (32,76–36,39)	23,60 (22,00–25,25)	70,25 (68,45–72,00)
Женщины / Women					
0–18	25,57 (24,66–26,50)	69,49 (68,51–70,45)	4,93 (4,49–5,41)	0,01 (0,00–0,06)	7,65 (7,08–8,26)
19–29	17,76 (17,13–18,42)	75,13 (74,39–75,85)	7,02 (6,63–7,50)	0,05 (0,02–0,11)	9,66 (9,12–10,21)
30–49	16,2 (15,85–16,56)	74,33 (73,90–74,75)	9,22 (8,94–9,50)	0,25 (0,20–0,30)	11,49 (11,14–11,84)
50–69	12,73 (12,38–13,02)	67,14 (66,65–67,63)	18,72 (18,31–19,12)	1,42 (1,30–1,54)	26,17 (25,65–26,70)
70–79	10,64 (9,97–11,34)	54,58 (53,47–55,68)	28,44 (27,45–29,45)	6,34 (5,81–6,90)	48,36 (47,14–49,58)
> 80	9,3 (8,56–10,07)	38,95 (37,69–40,23)	33,21 (32,00–34,44)	18,54 (17,54–19,57)	66,10 (64,85–67,34)

жёлтое течение диагностировано лишь в 1,42% (1,30–1,54) случаев. Значительный рост удельного веса тяжёлых форм COVID-19 отмечен у пациенток 70–79 лет и старше 80 лет — 6,34% (5,81–6,90) и 18,54% (17,54–19,57). Также с возрастом пациентов увеличивался удельный вес среднетяжёлых форм COVID-19 как среди мужчин, так и среди женщин. Так, в когорте мужчин у детей 0–18 лет среднетяжёлые формы COVID-19 диагностированы в 5,65% (5,18–6,15) случаев, тогда как у мужчин 70–79 лет и старше 80 лет — в 32,09% (30,77–33,43) и 34,56% (32,76–36,39) случаев соответственно. В когорте женщин с COVID-19 отмечены аналогичные закономерности. У девочек 0–18 лет среднетяжёлые формы заболевания диагностированы в 4,93% (4,49–5,41%) случаев, у женщин 70–79 и старше 80 лет — в 28,44% (27,45–29,45) и 33,21% (32,00–34,44) случаев соответственно.

Бессимптомную и лёгкую формы COVID-19 у пациентов 0–18 и 19–29 лет диагностировали значительно чаще, чем у лиц пожилого возраста. Так, в возрастных группах 0–18 и 19–29 лет удельный вес бессимптомной формы COVID-19 составлял: у мужчин — 25,29% (24,39–26,20) и 22,31% (21,54–23,14), у женщин — 25,57% (24,66–26,50) и 17,76% (17,13–18,42) соответственно. У пациентов 70–79 и старше 80 лет бессимптомную форму COVID-19 регистрировали: у мужчин — в 10,55% (9,70–11,45) и 8,36% (7,36–11,45) случаев, у женщин — в 10,64%

(9,97–11,34) и 9,30% (8,56–10,07) случаев соответственно.

Определение целевых групп населения по социальному и профессиональному статусу, наиболее активно вовлечённых в эпидемический процесс COVID-19, показало, что SARS-CoV-2 распространён практически во всех стратах общества, что характерно для возбудителей, передающихся посредством аэрозольного механизма. Вместе с тем, как показал анализ удельного веса пациентов с COVID-19, принадлежащих к различным социальным и профессиональным группам населения Санкт-Петербурга, можно выделить отдельные группы повышенного риска заражения (табл. 4).

Согласно данным, приведённым в табл. 4, наиболее высокий удельный вес среди пациентов с COVID-19 зафиксирован у нескольких групп населения. Так, пенсионеры среди заболевших COVID-19 составили в когорте мужчин 13,69% (13,43–13,96), в когорте женщин — 17,67% (17,43–17,92). Значительной оказалась доля рабочих, причём среди мужчин с COVID-19 она составила 20,04% (19,73–20,35), тогда как среди женщин существенно меньше — 9,99% (9,79–10,18). Удельный вес детей в общей когорте заболевших COVID-19 оказался весьма высоким, несмотря на то что на начальных этапах пандемии сформировалась точка зрения о незначительном вовлечении детей в эпидемический процесс. В когорте мужчин доля мальчи-

Таблица 4. Удельный вес пациентов с COVID-19, представляющих отдельные страты населения в Санкт-Петербурге, %
Table 4. Proportions of COVID-19 patients representing different strata of the St. Petersburg population, %

Социальный и профессиональный статус Social and occupational status	Мужчины, % (95% ДИ) Men, % (95% CI)	Женщины, % (95% ДИ) Women, % (95% CI)
Пенсионеры Retirees	13,69 (13,43–13,96)	17,67 (17,43–17,92)
Рабочие Blue-collar workers	20,04 (19,73–20,35)	9,99 (9,79–10,18)
Работники медицинских организаций Healthcare workers	3,67 (3,57–3,82)	9,41 (9,22–9,60)
Дети 0–18 лет Children aged 0–18 years	21,23 (20,92–21,54)	14,57 (13,94–14,39)
Служащие Office employees	9,38 (9,16–9,61)	7,88 (7,71–8,05)
Временно не работающие Temporarily not working	17,53 (17,24–17,83)	17,25 (17,01–17,50)
Работники образовательных организаций Education sector employees	1,92 (1,81–2,03)	6,32 (6,16–6,47)
Работники правоохранительных органов Law enforcement	1,31 (1,22–1,40)	0,63 (0,58–0,68)
Работники транспорта Transport workers	1,64 (1,55–1,74)	0,60 (0,55–0,65)
Проживающие в организациях соцзащиты Residents of long-term care facilities	0,12 (0,10–0,15)	0,17 (0,15–0,20)
Работники городского хозяйства Municipal workers	3,57 (2,43–3,71)	3,41 (3,29–3,53)

ков была 21,23% (20,92–21,54), в когорте женщин доля девочек — 14,57% (13,94–14,39).

Особую группу риска представляют медицинские работники, особенно те, кто работает в «красной» зоне. Медики-мужчины среди заболевших COVID-19 составили 3,67% (95% ДИ 3,57–3,82), а удельный вес женщин был значительно выше — 9,41% (95% ДИ 14,04–14,23). Временно не работающих граждан также можно отнести к группе риска среди заболевших COVID-19. Доля мужчин составила 17,53% (95% ДИ 14,04–14,23), женщин — 17,25% (95% ДИ 14,04–14,23). Работники образовательных учреждений, правоохранительных органов, транспорта, работники городского хозяйства, имеющие по долгу службы тесные контакты с населением, также входят в группы повышенного риска инфицирования, и их долю среди пациентов с COVID-19 следует признать весьма существенной. Значительная часть пациентов — 17,53% (17,24–17,83) мужчин и 17,25% (17,01–17,50) женщин — обозначила себя как временно не работающих, не пожелав обозначить свою принадлежность к какой-либо группе населения (табл. 4).

Обсуждение

Проанализирована эпидемиологическая ситуация по COVID-19 в Санкт-Петербурге за период с 02.03.2020 по 04.04.2021. За это время в Санкт-Петербурге зарегистрировано 397 477 случаев COVID-19 и 12 394 летальных исходов инфекции. К началу эпидемии, ещё до регистрации первых случаев COVID-19 в Санкт-Петербурге, правительством города был принят ряд нормативных документов, регламентирующих комплекс превентивных и противоэпидемических мер, что позволило избежать эксплозивного роста заболеваемости и подготовить медицинскую инфраструктуру города.

По прошествии года в динамике выявления случаев COVID-19 в Санкт-Петербурге можно выделить два эпидемических цикла (весенний и осенне-зимний) эволюции и 8 периодов эпидемии: период «завоза» (02.03.2020–31.03.2020), эпидемического подъёма (01.04.2020–16.05.2020), снижения (17.05.2020–31.07.2020), эпидемического затишья (01.08.2020–27.09.2020), сезонного роста (28.09.2020–29.11.2020), эпидемического максимума (30.11.2020–05.01.2021), снижения (06.01.2021–08.02.2021) и эпидемической стабильности (09.02.2021–04.04.2021). В динамике выявления случаев COVID-19 в Санкт-Петербурге обращает на себя внимание значительная разница в интенсивности двух подъёмов заболеваемости COVID-19. В начале эпидемии, включая периоды «завоза», эпидемического подъёма и снижения (весенний цикл роста/снижения), при условии полного отсутствия популяционного иммунитета к SARS-CoV-2, темпы роста выявления случаев COVID-19 составили

+4,6% в день, максимальное количество пациентов ($n = 540$) зарегистрировано 15.05.2020. Общая продолжительность этой фазы эпидемии COVID-19 в Санкт-Петербурге составила 140 дней, в течение которых заболели 31 461 человек.

Сезонный подъём заболеваемости COVID-19, период эпидемического максимума и снижения, которые составили осенне-зимний цикл роста/снижения, продолжался 133 дня, и общая численность пациентов составила 304 109 человек, что в 9,7 раза больше, чем за время весеннего цикла. При этом к началу осенне-зимнего цикла эпидемии COVID-19 в Санкт-Петербурге уже началось формирование иммунной прослойки населения, которой, очевидно, ещё было недостаточно для существенного влияния на распространение SARS-CoV-2. По данным А.Ю. Поповой с соавт., частота обнаружения антител к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период интенсивного распространения инфекции COVID-19 составила 26% [12]. Отличие весеннего цикла эпидемии COVID-19 состояло в существенно меньшей интенсивности и отсутствии периода стабильно высокого уровня заболеваемости (плато), тогда как в осенне-зимнем цикле этот период был весьма продолжительным (37 дней).

Гендерно-возрастной состав пациентов с COVID-19 в Санкт-Петербурге соответствовал закономерностям, описанным ранее при анализе эпидемиологической ситуации в Москве [10, 11]. Возрастная структура заболевших COVID-19 в Санкт-Петербурге характеризуется преобладанием пациентов двух возрастных групп: 30–49 и 50–69 лет. Их суммарный удельный вес в возрастной структуре заболевших COVID-19 за период наблюдения — 66,95% (66,78–67,11). Молодые люди в возрасте 19–29 лет среди пациентов с COVID-19 составляли 13,40% (13,21–13,58) и 12,56% (12,41–12,72) соответственно. Можно отметить преобладание мужчин среди заболевших COVID-19 до 50 лет, тогда как в старших возрастных группах удельный вес женщин был выше, что, очевидно, связано с особенностями гендерно-возрастного состава населения Санкт-Петербурга.

Вместе с тем реальный уровень вовлеченности в эпидемический процесс отражают интенсивные показатели. Расчёты уровня заболеваемости (в пересчёте на 100 тыс. населения каждой возрастной группы) в Санкт-Петербурге за анализируемый период отдельно для когорты мужчин и женщин позволили выявить наиболее поражаемые возрастные группы независимо от возрастной структуры населения Санкт-Петербурга. В когорте мужчин, переболевших COVID-19 за период наблюдения, значения показателя различных возрастных групп варьировали от 3109,6⁰/₀₀₀₀ (0–18 лет) до 6071,8⁰/₀₀₀₀ (50–69 лет). В когорте женщин различия между минимальным и максимальным значениями это-

го показателя были более значительными — от 3126,4⁰/₀₀₀₀ (0–18 лет) до 7137,7⁰/₀₀₀₀ (30–49 лет). Максимальный уровень заболеваемости COVID-19 у мужчин и женщин зафиксирован в различных возрастных группах. При этом в когорте мужчин значения показателя заболеваемости COVID-19 во всех возрастных группах, кроме 0–18 лет, различались незначительно, тогда как в когорте женщин разброс значений был более существенным. Так, соотношение уровней заболеваемости в когорте женщин возрастных групп 30–49 и старше 80 лет составило 1,7 раза. Можно констатировать, что в Санкт-Петербурге по такому критерию, как уровень заболеваемости COVID-19, среди мужчин нет возможности выделить возрастную группу, наиболее вовлечённую в эпидемический процесс. В то же время у женщин наиболее высокие значения показателя заболеваемости COVID-19 зарегистрированы в возрастных группах 19–29, 30–49 и 50–69 лет. Можно отметить, что у женщин уровень заболеваемости COVID-19 в возрастных группах 0–18, 19–29, 39–49 и 50–69 лет был выше, чем у мужчин, при том, что в группах пациентов старше 70 лет имела место обратная ситуация.

Важно констатировать, что в эпидемический процесс COVID-19 также активно вовлечены дети. Удельный вес детей 0–18 лет в возрастной структуре заболевших COVID-19 в Санкт-Петербурге составил 12,22% (12,05–12,40) пациентов мужского пола и 8,60% (8,47–8,73) пациентов женского пола. Несмотря на то, что уровень заболеваемости COVID-19 в этой возрастной группе был ниже, чем в остальных, его следует признать высоким. Особенностью этой возрастной группы пациентов с COVID-19 является наиболее высокий удельный вес бессимптомной формы COVID-19 как у мальчиков, так и у девочек — 25,29% (24,39–26,20) и 25,57% (24,66–26,50) соответственно. Эта особенность COVID-19 обуславливает особую эпидемиологическую значимость пациентов этой возрастной группы.

Диагностика бессимптомной формы COVID-19 весьма затруднительна, и есть основания полагать, что в настоящее время удаётся выявить далеко не все случаи таких вариантов заболевания. Оставаясь вне поля зрения медиков, пациенты с бессимптомной формой COVID-19 не имеют ограничений, предусмотренных для пациентов с COVID-19, и могут являться активными источниками распространения SARS-CoV-2, которые обеспечивают поддержание эпидемического процесса. Важно отметить, что удельный вес бессимптомных форм COVID-19 в разных странах, согласно опубликованным данным, весьма вариабелен. Так, по данным D.P. Oran и соавт. [13], в Италии у 42% и в США у 44–96% пациентов с COVID-19 зарегистрирована бессимптомная форма заболевания. N.A. Patel [14], обоб-

щивший результаты исследователей различных стран (США, Испания, Китай, Иран), показал, что у детей в возрасте 0–17 бессимптомное течение COVID-19 регистрировали с весьма различной частотой — от 0% до 53%. В обзоре M. Yanes-Lane и соавт. [15] указывается, что бессимптомные формы выявляли среди заболевших COVID-19 в Италии в 75% случаев, в Германии — в 50%, в Южной Корее — в 8,2%. M. Gandhi и соавт. [16], обследовавшие всех пациентов крупного стационара в Калифорнии (США), контактировавших с заболевшим COVID-19 врачом, показали, что у 53% из всех заразившихся пациентов COVID-19 протекал бессимптомно.

Важной характеристикой эпидемии COVID-19 в России является соотношение различных по тяжести течения форм заболевания. В Санкт-Петербурге за весь период наблюдения с наибольшей частотой диагностировали лёгкую и среднетяжёлые формы COVID-19. В разные периоды эпидемии COVID-19 лёгкую форму COVID-19 диагностировали у мужчин — от 25,09% (20,18–30,52) в период «завоза» до 73,60% (73,06–74,14) пациентов в период снижения заболеваемости (06.01.2021–08.02.2021) и у женщин — от 23,92% (20,10–30,24) в период завоза и до 76,26% (75,82–76,70) пациентов в период снижения заболеваемости (06.01.2021–08.02.2021). Следует отметить общую закономерность — увеличение доли лёгких форм COVID-19 по мере развития эпидемии. Удельный вес среднетяжёлых форм COVID-19 в разные периоды эпидемии различался, что, по нашему мнению, являлось следствием повышения диагностических возможностей. Так, в периоды, составляющие весенний цикл эпидемии COVID-19 в Санкт-Петербурге, доля среднетяжёлого течения заболевания составляла у мужчин от 21,51% (20,54–22,50) в период эпидемического подъёма до 53,66% (47,70–59,54) в период «завоза». В остальные периоды эпидемии COVID-19 доля среднетяжёлых форм была существенно ниже и варьировала от 12,48% (12,07–12,89) в период снижения (06.01.2021) до 17,82% (17,08–18,57) в период сезонного подъёма (28.09.2020–29.11.2020). В когорте женщин, заболевших в течение всего периода наблюдения, в структуре по тяжести течения COVID-19 выявлены те же закономерности (табл. 2).

Соотношение по тяжести течения COVID-19 у пациентов различных возрастных групп существенно различалось независимо от гендерной принадлежности. Отчётливо выражено снижение доли бессимптомной и лёгкой форм COVID-19. Если у пациентов в возрасте 0–18 и 19–29 лет бессимптомную форму диагностировали у мужчин в 25,29% (24,39–26,20) и 22,31% (21,54–23,14) случаев и у женщин в 25,57% (24,66–26,50) и 12,76% (17,13–18,42) случаев, то у пациентов старше 80 лет — в 8,36% (7,36–9,47) и 9,3% (8,56–10,07) случаев соответ-

ственно. Обратная зависимость отмечена для среднетяжёлых и тяжёлых форм COVID-19, чья доля значительно увеличивалась с увеличением возраста пациентов. Можно констатировать, что закономерности в соотношении форм течения COVID-19 в Санкт-Петербурге соответствуют выявленным ранее как в России, так и в других странах [9, 17–19]. Анализируя факторы, которые могут быть связаны с тяжёлым течением COVID-19 на когорте пациентов со средним возрастом 69 лет, Е. Jiménez и соавт. [20] показали наличие прямой зависимости от пожилого возраста, неврологических заболеваний, хронических заболеваний почек и онкологии.

Проведённый эпидемиологический анализ эпидемии COVID-19 в Санкт-Петербурге за относительно продолжительный период (более года), в течение которого зафиксированы два эпидемических цикла и разделяющий их период эпидемического затишья, позволяет сделать ряд выводов, основанных на значительном фактическом материале:

1. С большой долей вероятности можно предполагать, что COVID-19 формируется как сезонное заболевание с ежегодными осенне-зимними эпидемическими циклами.

2. В структуре заболевших COVID-19 отсутствует гендерно-возрастная избирательность, о чём свидетельствуют относительно равномерные показатели заболеваемости, пересчитанные на 100 тыс. каждой возрастной группы населения.

3. Отсутствуют гендерно-возрастные различия в структуре заболевших COVID-19 в отдельные периоды эпидемии в Санкт-Петербурге.

4. Отчётливо выражена зависимость тяжести течения COVID-19 от возраста пациентов: тяжёлые формы заболевания чаще диагностированы у пациентов старше 70 лет независимо от гендерной принадлежности.

5. Наиболее вовлечёнными в эпидемический процесс COVID-19 в Санкт-Петербурге группами населения были пенсионеры, а также рабочие разных специальностей, главным образом, обеспечивающие деятельность городского хозяйства.

К настоящему времени остаётся ещё много неясных и требующих изучения вопросов. Представляется важным исследовать особенности течения и последствий COVID-19, особенно при его бессимптомном течении, поскольку сейчас отсутствует полное понимание об интенсивности и сроках выделения SARS-CoV-2 во внешнюю среду, вероятности повторного заражения, в частности другим генетическим вариантом вируса, особенностях «пост-COVID-19» и др. Отсутствие точных знаний об этих характеристиках COVID-19 не позволит выстроить эффективную систему эпидемиологического надзора.

Весьма важной особенностью COVID-19 являются тяжёлые осложнения острой фазы заболева-

ния, которые регистрируют с очень высокой частотой. У подавляющего большинства пациентов (до 80%), перенёсших COVID-19, выявлены долгосрочные осложнения, зачастую их комплекс. По данным L.T. McDonald, весьма частым осложнением (до 62%) является фиброз лёгких [21]. О. Sinanović и соавт. выявили частые нейропсихические расстройства: депрессию (20,1%), тревожные расстройства (35,1%), нарушения сна (18,2%) [22]. С высокой частотой регистрируют неврологические расстройства [23], нарушения в работе почек [24]. Доказано, что пациенты с COVID-19 подвержены высокому риску тромботических окклюзий артерий и вен, следствием чего может быть развитие инфарктов и инсультов [25].

Начавшаяся массовая вакцинация против COVID-19 в России является доступной противоэпидемической мерой, эпидемиологическая значимость которой станет ясна после старта следующей осенне-зимнего сезонного подъёма.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill.* 2021; 26(1): 2002106. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.26.1.2002106>
2. Dey T., Chatterjee S., Manna S., Nandy A., Basak S.C. Identification and computational analysis of mutations in SARS-CoV-2. *Comput. Biol. Med.* 2021; 129: 104166. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.104166>
3. Rahimi F., Talebi Bezmin Abadi A. Implications of the emergence of a new variant of SARS-CoV-2, VUI-202012/01. *Arch. Med. Res.* 2021; 52(5): 569–71. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2021.01.001>
4. Du Z., Wang L., Yang B., Ali S.T., Tsang T.K., Shan S., et al. Risk for international importations of variant SARS-CoV-2 originating in the United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(5): 1527–9. <https://doi.org/10.3201/eid2705.210050>
5. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat. Med.* 2021; 27(4): 622–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01285-x>
6. Tegally H., Wilkinson E., Lessells R.J., Giandhari J., Pillay S., Msomi N., et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa. *Nat. Med.* 2021; 27(3): 440–6. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01255-3>
7. Villoutreix B.O., Calvez V., Marcelin A.G., Khatib A.M. In silico investigation of the new UK (B.1.1.7) and South African (501Y.V2) SARS-CoV-2 variants with a focus at the ACE2-spike RBD interface. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(4): 1695. <https://doi.org/10.3390/ijms22041695>
8. Ortuso F., Mercatelli D., Guzzi P.H., Giorgi F.M. Structural genetics of circulating variants affecting the SARS-CoV-2 spike/human ACE2 complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021; 1–11. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1886175>
9. 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 2: особенности течения эпидемического процесса COVID-19 во взаимосвязи с проводимыми противоэпидемическими мероприятиями в мире

- и Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 6–12.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-6-12>
10. 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>
11. 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>
12. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В. и др. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 124–30.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130>
13. Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A narrative review. *Ann. Intern. Med.* 2020; 173(5): 362–7. <https://doi.org/10.7326/m20-3012>
14. Patel N.A. Pediatric COVID-19: systematic review of the literature. *Am. J. Otolaryngol.* 2020; 41(5): 102573.
<https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102573>
15. Yanes-Lane M., Winters N., Fregonese F., Bastos M., Perlman-Arrow S., Campbell J.R., et al. Proportion of asymptomatic infection among COVID-19 positive persons and their transmission potential: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020; 15(11): e0241536.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241536>
16. Gandhi M., Yokoe D.S., Havlir D.V. Asymptomatic transmission, the Achilles' heel of current strategies to control COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(22): 2158–60.
<https://doi.org/10.1056/nejme2009758>
17. Chhabra H.S., Bagaria V., Keny S., Kalidindi K.K.V., Mallepally A., Dhillon M.S., et al. COVID-19: Current knowledge and best practices for orthopedic surgeons. *Indian J. Orthop.* 2020; 54(4): 1–15.
18. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York city area. *JAMA*. 2020; 323(20): 2052–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
19. Grasselli G., Zangrillo A., Zanella A., Antonelli M., Cabrini L., Castelli A., et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *JAMA*. 2020; 323(16): 1574–81.
<https://doi.org/10.1001/jama.2020.5394>
20. Jiménez E., Fontán-Vela M., Valencia J., Fernandez-Jimenez I., Alvaro-Alonso E.A., Izquierdo-García E., et al. Characteristics, complications and outcomes among 1549 patients hospitalized with COVID-19 in a secondary hospital in Madrid, Spain: a retrospective case series study. *BMJ Open*. 2020; 10(11): e042398.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-042398>
21. McDonald L.T. Healing after COVID-19: are survivors at risk for pulmonary fibrosis? *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2021; 320(2): L257–65.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00238.2020>
22. Sinanović O., Muftić M., Sinanović S. COVID-19 pandemia: neuropsychiatric comorbidity and consequences. *Psychiatr. Danub.* 2020; 32(2): 236–44.
<https://doi.org/10.24869/psyd.2020.236>
23. Iadecola C., Anrather J., Kamel H. Effects of COVID-19 on the nervous system. *Cell*. 2020; 183(1): 16–27.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.028>
24. Sanchez-Russo L., Billah M., Chancay J., Hindi J., Cravedi P. COVID-19 and the kidney: a worrisome scenario of acute and chronic consequences. *J. Clin. Med.* 2021; 10(5): 900.
<https://doi.org/10.3390/jcm10050900>
25. Вознюк И.А., Ильина О.М., Коломенцев С.В. Ишемический инсульт как клиническая форма и патогенетическая модель в структуре поражения центральной нервной системы при COVID-19. *Вестник восстановительной медицины*. 2020; 98(4): 90–8.
<https://doi.org/10.38025/2078-1962-2020-98-4-90-98>

REFERENCES

1. Leung K., Shum M.H., Leung G.M., Lam T.T., Wu J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill.* 2021; 26(1): 2002106.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.26.1.2002106>
2. Dey T., Chatterjee S., Manna S., Nandy A., Basak S.C. Identification and computational analysis of mutations in SARS-CoV-2. *Comput. Biol. Med.* 2021; 129: 104166.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.104166>
3. Rahimi F., Talebi Bezmin Abadi A. Implications of the emergence of a new variant of SARS-CoV-2, VUI-202012/01. *Arch. Med. Res.* 2021; 52(5): 569–71.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2021.01.001>
4. Du Z., Wang L., Yang B., Ali S.T., Tsang T.K., Shan S., et al. Risk for international importations of variant SARS-CoV-2 originating in the United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(5): 1527–9. <https://doi.org/10.3201/eid2705.210050>
5. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat. Med.* 2021; 27(4): 622–5.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01285-x>
6. Tegally H., Wilkinson E., Lessells R.J., Giandhari J., Pillay S., Msomi N., et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa. *Nat. Med.* 2021; 27(3): 440–6.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01255-3>
7. Villoutreix B.O., Calvez V., Marcelin A.G., Khatib A.M. In silico investigation of the new UK (B.1.1.7) and South African (501Y.V2) SARS-CoV-2 variants with a focus at the ACE2-spike RBD interface. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(4): 1695.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041695>
8. Ortuso F., Mercatelli D., Guzzi P.H., Giorgi F.M. Structural genetics of circulating variants affecting the SARS-CoV-2 spike/human ACE2 complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021; 1–11.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1886175>
9. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Smolenskiy V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Safronov V.A., et al. Epidemiological peculiarities of new coronavirus infection (Covid-2019). Communication 2: peculiarities of epidemic process development in conjunction with performed anti-epidemic measures around the world and in the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (2): 6–12.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-6-12> (in Russian)
10. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В. 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. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., 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)
12. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., et al. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population in Saint-Petersburg during the COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*.

- 2020; (3): 124–30.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130>
(in Russian)
13. Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A narrative review. *Ann. Intern. Med.* 2020; 173(5): 362–7.
<https://doi.org/10.7326/m20-3012>
 14. Patel N.A. Pediatric COVID-19: systematic review of the literature. *Am. J. Otolaryngol.* 2020; 41(5): 102573.
<https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102573>
 15. Yanes-Lane M., Winters N., Fregonese F., Bastos M., Perlman-Arrow S., Campbell J.R., et al. Proportion of asymptomatic infection among COVID-19 positive persons and their transmission potential: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020; 15(11): e0241536.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241536>
 16. Gandhi M., Yokoe D.S., Havlir D.V. Asymptomatic transmission, the Achilles' heel of current strategies to control COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(22): 2158–60.
<https://doi.org/10.1056/nejme2009758>
 17. Chhabra H.S., Bagaraia V., Keny S., Kalidindi K.K.V., Mallepally A., Dhillon M.S., et al. COVID-19: Current knowledge and best practices for orthopedic surgeons. *Indian J. Orthop.* 2020; 54(4): 1–15.
 18. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York city area. 2020; 323(20): 2052–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775>
 19. Grasselli G., Zangrillo A., Zanella A., Antonelli M., Cabrini L., Castelli A., et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *JAMA.* 2020; 323(16): 1574–81.
<https://doi.org/10.1001/jama.2020.5394>
 20. Jiménez E., Fontán-Vela M., Valencia J., Fernandez-Jimenez I., Álvaro-Alonso E.A., Izquierdo-García E., et al. Characteristics, complications and outcomes among 1549 patients hospitalised with COVID-19 in a secondary hospital in Madrid, Spain: a retrospective case series study. *BMJ Open.* 2020; 10(11): e042398.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-042398>
 21. McDonald L.T. Healing after COVID-19: are survivors at risk for pulmonary fibrosis? *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2021; 320(2): L257–65.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00238.2020>
 22. Sinanović O., Muftić M., Sinanović S. COVID-19 pandemia: neuropsychiatric comorbidity and consequences. *Psychiatr. Danub.* 2020; 32(2): 236–44.
<https://doi.org/10.24869/psyd.2020.236>
 23. Iadecola C., Anrather J., Kamel H. Effects of COVID-19 on the nervous system. *Cell.* 2020; 183(1): 16–27.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.028>
 24. Sanchez-Russo L., Billah M., Chancay J., Hindi J., Cravedi P. COVID-19 and the kidney: a worrisome scenario of acute and chronic consequences. *J. Clin. Med.* 2021; 10(5): 900.
<https://doi.org/10.3390/jcm10050900>
 25. Voznyuk I.A., Il'ina O.M., Kolomentsev S.V. Ischemic stroke as a clinical form and pathogenetic model in the structure of central nervous system lesions in Covid-19. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny.* 2020; 98(4): 90–8.
<https://doi.org/10.38025/2078-1962-2020-98-4-90-98>
(in Russian)

Информация об авторах

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

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

Колосовская Елена Николаевна — д.м.н., доцент, консультант организационно-методического отдела ЦНИИ эпидемиологии Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6667-2377>

Кудрявцева Елена Николаевна — д.б.н., консультант организационно-методического отдела ЦНИИ эпидемиологии Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7325-8577>

Семененко Татьяна Анатольевна — д.м.н., проф., 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>

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>

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>

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

Каленская Анна Валентиновна — зам. рук. направления лабораторной медицины и продвижения лабораторных услуг по клиентскому сервису отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9126-1155>

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>

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

Elena N. Kolosovskaya — D. Sci. (Med.), Associate Professor, consultant, Organizational and methodological department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6667-2377>

Elena N. Kudryavtseva — D. Sci. (Biol.), consultant, Organizational and methodological department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7325-8577>

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. Gamaleya, 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>

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>

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>

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

Anna V. Kalenskaya — Deputy 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/0000-0002-9126-1155>

Яцышина Светлана Борисовна — к.б.н., с.н.с. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

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

Родионова Елена Николаевна — к.м.н., зав. лаб. по разработке и производству препаратов для диагностики инфекционных заболеваний человека и животных ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0192-1832>

Петрова Наталья Сергеевна — к.б.н., главный технолог научно-производственной лаборатории ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0166-555X>

Соловьева Ирина Владимировна — рук. группы обеспечения качества Клинико-диагностической лаборатории ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Квасова Ольга Андреевна — врач-эпидемиолог лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4545-1804>

Вершинина Марина Анатольевна — ведущий консультант по лабораторной медицине отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8582-5199>

Мамошина Марина Васильевна — м.н.с. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>

Клушкина Виталина Владимировна — к.м.н., врач-эпидемиолог лаборатории вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8311-8204>

Корабельникова Марина Игоревна — консультант организационно-методического отдела ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2575-8569>

Чурилова Надежда Сергеевна — лаборант-исследователь лаборатории вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5344-5829>

Панасюк Ярина Васильевна — врач-эпидемиолог лаборатории вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9335-4953>

Власенко Наталья Викторовна — лаборант-исследователь лаборатории вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>

Остроушко Алексей Александрович — руководитель информационно-аналитической службы отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0803-5630>

Балмасов Евгений Сергеевич — системный аналитик информационно-аналитической службы отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3382-2441>

Мосунов Артем Васильевич — ведущий аналитик отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6743-3650>

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 15.04.2021;
принята к публикации 25.06.2021;
опубликована 18.10.2021

Svetlana B. Yatsishina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Olga Yu. Shipulina — Cand. Sci. (Med.), Head, Division of laboratory medicine and promotion of laboratory services, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

Elena N. Rodionova — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory for the development and production of drugs for the diagnosis of infectious diseases in humans and animals, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0192-1832>

Natalia S. Petrova — Cand. Sci. (Biol.), chief technologist, Research and production laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0166-555X>

Irina V. Solov'eva — Head, Quality assurance group, Clinical diagnostic laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Olga A. Kvasova — doctor-epidemiologist, Laboratory of infections associated with the provision of medical care, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4545-1804>

Marina A. Vershinina — leading consultant in laboratory medicine, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8582-5199>

Marina V. Mamoshina — junior researcher, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>

Vitalina V. Klushkina — Cand. Sci. (Med.), doctor-epidemiologist, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8311-8204>

Marina I. Korabel'nikova — consultant, Organizational and methodological department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2575-8569>

Nadezhda S. Churilova — research laboratory assistant, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5344-5829>

Yarina V. Panasyuk — doctor-epidemiologist, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9335-4953>

Natalia V. Vlasenko — research laboratory assistant, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>

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

Evgeniy S. Balmasov — systems analyst, Information and analytical service, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3382-2441>

Artem V. Mosunov — leading analyst, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6743-3650>

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 15.04.2021;
accepted for publication 25.06.2021;
published 18.10.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-144>

Антигенная и генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования

Миронов К.О.^{1✉}, Гапонова И.И.¹, Корчагин В.И.¹, Михайлова Ю.В.¹, Шеленков А.А.¹, Каптелова В.В.¹, Чагарян А.Н.², Иванчик Н.В.², Козлов Р.С.²

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

²НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск, Россия

Аннотация

Цель работы заключалась в характеристике и сопоставлении данных об антигенных и генетических свойствах полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными формами пневмококковой инфекции (ПИ).

Материалы и методы. Исследовано 158 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных при проведении различных этапов многоцентрового исследования «ПеГАС» в 2015–2020 гг. При анализе данных использовалась информация о полногеномных последовательностях 46 штаммов, выделенных ранее в том же исследовании. Для определения серотипов применены методики ПЦР в режиме реального времени и высокопроизводительное секвенирование (платформа «Illumina»). При обработке данных использовались программы «SeroBA», «PneumoCaT» и программные возможности интернет-ресурса PubMLST.org.

Результаты и обсуждение. Определены серотипы всех штаммов, включённых в исследование. Найден ряд несовпадений серотипов внутри серогруппы 6 и один дискордантный результат при анализе полногеномных последовательностей двумя программами. Предлагаемые ПЦР-подходы позволяют охарактеризовать серотип у 87% возбудителей инвазивных и 69% неинвазивных форм ПИ. Доля штаммов с серотипами, входящими в состав PCV13, составляет 59 и 37%, в состав PPV23 — 78 и 53% для штаммов, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными ПИ соответственно. Анализ данных не позволяет выявить преобладающий сиквенс-тип (всего найден 81 сиквенс-тип) или определить клональные комплексы, за исключением штаммов серотипа 3, что согласуется с полученными ранее данными об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с пневмококковыми менингитами, на территории России.

Заключение. Получены данные, позволяющие определить распределение циркулирующих серотипов и генетические характеристики штаммов, выделенных от больных ПИ, что даёт возможность оценить эффективность существующих поливалентных вакцин и предоставляет информацию для коррекции основанных на ПЦР способов серотипирования.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, инвазивные пневмококковые инфекции, неинвазивные пневмококковые инфекции, высокопроизводительное секвенирование, серотипирование, ПЦР в режиме реального времени, мультилокусное секвенирование-типирование

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Смоленского государственного медицинского университета (протокол № 213 от 11.10.2018).

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: Миронов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Каптелова В.В., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С. Антигенная и генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):512–518.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-144>

Antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections by using high-throughput sequencing

Konstantin O. Mironov¹✉, Irina I. Gaponova¹, Vitaly I. Korchagin¹, Yulia V. Mikhailova¹, Andrey A. Shelenkov¹, Valeriya V. Kaptelova¹, Aida N. Chagaryan², Natali V. Ivanchik², Roman S. Kozlov²

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Abstract

The **objective** of this study was to characterize and compare antigenic and genetic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections (PIs) by using the data of *high-throughput sequencing*.

Materials and methods. A total of 158 *S. pneumoniae* strains were studied. All of them were isolated during different stages of the PEHASus multicenter study performed in 2015–2020. The data analysis was based on the information about whole-genome sequences of 46 strains isolated during the above study. Real-time PCR methods and high-throughput sequencing (the Illumina platform) were used for identification of serotypes. The SeroBA, PneumoCaT software and PubMLST.org website resources were used in the data processing.

Results and discussion. The serotypes of all the studied strains were identified. A number of discrepancies among serotypes in serogroup 6 and one discordant result were revealed by the analysis of whole-genome sequences using 2 programs. The PCR methods were effectively used to characterize serotypes in 87% and 69% of the pathogens of invasive and non-invasive PIs, respectively. The serotypes contained in PCV13 accounted for 59% and 37%, while PPV23 serotypes accounted for 78% and 53% of the strains isolated from patients with invasive and non-invasive PIs, respectively. The data analysis was unable to identify either the dominant sequence type (a total of 81 sequence types have been identified) or clonal complexes, except for serotype 3 strains, thus demonstrating consistency with the data from previous studies suggesting the absence of a well-represented clonal structure of *S. pneumoniae* associated with pneumococcal meningitis in Russia.

Conclusion. The obtained data made it possible to identify the distribution of the circulating serotypes and genetic characteristics of the strains isolated from PI patients, thus being instrumental for assessment of the effectiveness of the existing polyvalent vaccines and providing information for improvement of the PCR-based methods of serotyping.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, invasive pneumococcal infections, non-invasive pneumococcal infections, high-throughput sequencing, serotyping, real-time PCR, multilocus sequence typing

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Smolensk State Medical University (No. 213, October 11, 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: Mironov K.O., Gaponova I.I., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Shelenkov A.A., Kaptelova V.V., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S. Antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections by using high-throughput sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5): 512–518.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-144>

Введение

Streptococcus pneumoniae является одним из распространённых патогенов человека, способных вызывать инфекции различной локализации. Клинически принято выделять инвазивные и неинвазивные пневмококковые инфекции (ПИ) [1]. К инвазивным формам относят инфекции, при которых возбудитель выделен из стерильных в норме локусов (например, кровь или спинномозговая жидкость). К неинвазивным формам относят в том числе небактериемиче-

ские пневмонии, при которых возбудитель может быть выделен из отделяемого нижних дыхательных путей. В этой связи далее в статье инвазивными и неинвазивными штаммами будут обозначены культуры микроорганизмов, выделенные от больных соответствующими формами ПИ.

Важным элементом эпидемиологического надзора за ПИ является микробиологический мониторинг, включающий антигенную и генетическую характеристики возбудителей ПИ, а также данные

о чувствительности к антибиотикам. Антигенная характеристика возбудителей заключается в определении серотипов, что позволяет оценить эффективность существующих поливалентных вакцин. В России широкое применение получили 13-валентная конъюгированная пневмококковая вакцина (PCV13, «Превенар 13») и 23-валентная полисахаридная вакцина (PPV23, «Пневмовакс 23»). Определение спектра серотипов возбудителей ПИ позволяет планировать иммунопрофилактические мероприятия и оценивать их эффективность в группах лиц, вовлечённых в эпидемический процесс.

Если чувствительность к антибиотикам оценивается, согласно рекомендациям EUCAST [2, 3], с использованием стандартных микробиологических методов и, в связи с многообразием механизмов резистентности [1], она не всегда может быть исследована с использованием молекулярно-биологических методов, то эффективность использования молекулярно-биологических методов для определения серогрупп и серотипов (ключевой элемент антигенной характеристики *S. pneumoniae*) была неоднократно показана в отечественных и зарубежных исследованиях [4–7]. Определение генетических свойств штаммов *S. pneumoniae* с использованием мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) или других подходов, основанных на анализе полногеномных данных, позволяет описать клональную структуру микроорганизмов, вовлечённых в эпидемический процесс, оценить рекомбинационный потенциал бактериальной популяции и охарактеризовать эволюционные процессы, приводящие к возникновению новых потенциально вирулентных или резистентных к антибиотикам штаммов [1, 8–10].

Антигенная и генетическая характеристики могут быть определены с использованием молекулярно-биологических методов, таких как ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РПВ) и секвенирование. Применение высокопроизводительного секвенирования позволяет получить исчерпывающую характеристику микроорганизмов на основании анализа их полногеномных сиквенсов: последовательностей генов *crs*-локуса для определения серотипов и данных о первичных последовательностях локусов «основного генома» (*core genome*), анализ которых обладает максимальной дискриминирующей способностью для определения генетических взаимоотношений штаммов и определения клональной структуры бактериальной популяции. Несмотря на очевидные преимущества ПЦР-РПВ для определения серотипов, эффективность её применения не всегда очевидна, что обусловлено постоянной адаптацией возбудителей под давлением популяционного иммунитета, в том числе обусловленного иммунопрофилактикой с использованием поливалентных вакцин. К настоящему времени

известно не менее 100 серотипов *S. pneumoniae*, из которых значительная часть ассоциирована с инвазивными ПИ [1, 11], что диктует необходимость изучения штаммов, не типизируемых с помощью стандартных серологических или основанных на ПЦР методик, с целью оптимизации существующих лабораторных подходов, например, за счёт использования дополнительных серотип-специфических мишеней, и даёт информацию об эпидемиологических особенностях циркулирующих возбудителей для эффективного планирования и контроля эффективности программ по вакцинации.

В связи с этим **цель** данного исследования заключалась в характеристике с помощью высокопроизводительного секвенирования штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными формами ПИ, сравнительном анализе их антигенных и генетических свойств в контексте проводимого микробиологического мониторинга.

Материалы и методы

Проведено исследование 22 инвазивных штаммов (выделены из крови или спинномозговой жидкости) и 90 неинвазивных штаммов (выделены из мокроты больных внебольничными пневмониями пневмококковой этиологии) *S. pneumoniae*. Все штаммы были получены при проведении различных этапов многоцентрового исследования «ПеГАС» в 2015–2020 гг. [2]. Большинство штаммов, охарактеризованных в данном исследовании, и инвазивные штаммы, также полученные при проведении исследования «ПеГАС» и охарактеризованные ранее [5], были выделены в 2019 ($n = 58$) и 2020 гг. ($n = 47$).

Условия транспортировки и хранения, микробиологические методы, методы видовой идентификации, методика выделения ДНК, процедура полногеномного секвенирования и сборки генома описаны ранее [2, 5]. Все штаммы были дополнительно исследованы с использованием методики ПЦР-РПВ для определения 16 серотипов [4] и с помощью дополнительно разработанной методики для определения серотипов 12F, 15BC, 22FA и 8. Реакционные смеси для ПЦР-РПВ содержат набор из 4 серотип-специфических олигонуклеотидов, соответствующих группам, представленным в **табл. 1**. Для определения серотипов на основе данных полногеномного секвенирования использовали программу «SeroBA» [6] и «PneumoCaT» [7].

Депонирование нуклеотидных последовательностей, обработка результатов секвенирования с обозначением аллелей и сиквенс-типов, а также анализ данных МЛСТ с помощью программных модулей BURST и Genome Comparator проводили с использованием интернет-ресурса PubMLST.org¹ [9].

¹ PubMLST. Streptococcus pneumoniae MLST Databases.

URL: <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae>

Таблица 1. Группы серотипов, выявленные у инвазивных и неинвазивных штаммов

Table 1. Serotype groups identified in invasive and non-invasive strains

Группы серотипов Serotype groups		Инвазивные штаммы Invasive strains (n = 68)	Неинвазивные штаммы Non-invasive strains (n = 90)	χ^2 (p-value)*
Методики ПЦР-РРВ Methods RT-PCR	3, 6AB, 9VA, 19F	26 (38%)	28 (31%)	0,59 (0,44)
	1, 4, 14, 23F	11 (16%)	9 (10%)	0,84 (0,36)
	9NL, 11AD, 15AF, 18	6 (9%)	11 (12%)	0,18 (0,67)
	2, 5, 7AF, 19A	3 (4%)	0	0,08**
	8, 12F, 15BC, 22FA	13 (19%)	14 (16%)	0,14 (0,71)
	Всего / Total	59 (87%)	62 (69%)	5,94 (0,015)
Входящие в вакцины Included in vaccines	PCV13	40 (59%)	33 (37%)	6,78 (0,009)
	PPSV23	53 (78%)	48 (53%)	9,13 (0,0025)

Примечание. * χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса; **точный тест Фишера, p-value.
Note. * χ^2 of Pearson with Yates correction; **Fisher's exact test, p-value.

На момент окончания исследования база данных со-держала информацию о более чем 37 тыс. геномов *S. pneumoniae*, включая 288 полногеномных последовательностей российских изолятов, охарактеризованных преимущественно в работах [5, 10]. Поскольку ранее нами была исследована выборка из 46 инвазивных штаммов, также выделенных в рамках исследования «ПеГАС», при сопоставлении результатов антигенной и генетической характеристик инвазивных и неинвазивных штаммов использована объединённая выборка инвазивных штаммов (n = 68), включающая штаммы, описанные нами ранее [5].

Результаты

Полногеномные нуклеотидные последовательности изученных штаммов, данные о серотипах и чувствительности к антибиотикам (для большинства штаммов), а также информация об источниках штаммов внесены в базу PubMLST, идентификационные номера (id): инвазивные штаммы — 73010, 73011, 73013–73015, 73017–73033, неинвазивные штаммы — 142542, 142543, 142546–142569, 142572–142574, 142578, 142579, 142581, 142583–142604, 142606–142610, 142612–142625, 142627–142643. Для всех штаммов определены аллельные профили и соответствующие им сиквенс-типы, при этом часть аллелей и сиквенс-типов были описаны впервые.

В результате анализа полногеномных данных с использованием двух программ [6, 7] удалось определить серотиповую принадлежность всех изученных штаммов. При этом у неинвазивных штаммов наблюдались несовпадения при определении серотипов, принадлежащих серогруппам 6 (определялись серотипы В или С, А или В и Д или С), у 5 штаммов, 15 (В или С) — у 3 штаммов и 35 (А или С) — у 1 штамма, однократно был получен дискордантный результат: у изолята id142633 серотип определён неоднозначным образом (35А или 42).

Несоответствий между определением серотипов *in silico* и при использовании методик ПЦР-РРВ для определения серотипов не выявлено.

Обсуждение

Антигенная характеристика

Всего у инвазивных и неинвазивных штаммов было найдено 28 и 33 варианта серотипов соответственно (неповторяющихся — 42). Наиболее часто (более чем у 5%) у инвазивных штаммов были найдены серотипы 3 (18%), 19F (9%) и 23F (7%), у неинвазивных — 3 (11%), 19F (10%), 15С (8%) и 11А (8%), 23F (7%) и 23А (6%). В табл. 1 представлены данные о частотах серотипов, разделённых по группам, для обеих выборок штаммов. Группам серотипов соответствуют серотип-специфические мишени, детектируемые методиками ПЦР-РРВ, и капсульные антигены, входящие в состав поливалентных вакцин PCV13 и PPSV23. Как следует из табл. 1, доля штаммов, серотип которых может быть определён с помощью методики ПЦР-РРВ для 16 серотипов [4], включающей все серотипы вакцины PCV13, составляет 67% для инвазивных штаммов и 53% для неинвазивных. Эти значения соответствуют доле определённых серотипов (65%), полученных при исследовании возбудителей пневмококкового менингита, циркулирующих на территории Москвы в сопоставимый промежуток времени (2016–2019 гг.) [12], и ниже (79%) циркулирующих ранее (2007–2010 гг.) [4]. Уменьшение доли серотипов, входящих в состав вакцины PCV13, может объясняться как изменяющимся спектром антигенного разнообразия *S. pneumoniae*, связанным с вакцинацией, так и территориальным разнообразием возбудителей, включённых в данное исследование и изученных при проведении различных этапов исследования «ПеГАС» [2]. Детекция дополнительных серотип-специфических мишеней 12F, 15BC, 22FA и 8 позволяет повысить долю

определяемых серотипов до 87 и 69%, при этом наблюдается статистически значимое различие между выборками. Разработанная в 2014 г. методика ПЦР-PPV и предложенный алгоритм её использования [4] не оптимальны как для инвазивных, так и для неинвазивных штаммов в охарактеризованной выборке, собранной на территории нескольких регионов России и циркулирующей преимущественно в 2019–2020 гг. Оптимальный способ определения серотипов методом ПЦР-PPV должен включать дополнительные серотип-специфические мишени 12F, 15BC, 22FA и 8, при этом детекция серотипов 2, 5, 7AF и 19A может не проводиться.

Доля серотипов, входящих в вакцины PCV13 и PPSV23, для исследованных выборок штаммов различна, при этом доля входящих в вакцины серотипов статистически значимо выше в выборке инвазивных штаммов для обеих вакцин.

Генетическая характеристика

У изученных штаммов в совокупности с результатами исследования [5] был выявлен 81 сиквенс-тип, из которых наиболее часто встречались ST-180 (6%), ST-505 (5%), ST-1025, ST-1262 и ST-6202 (по 4%), ST-81 и ST-239 (по 3%). В обеих выборках штаммов максимальное количество сиквенс-типов было выявлено однократно. Из 81 сиквенс-типа 18 (22%) встречались в обеих выборках штаммов, 27 (33%) сиквенс-типов — только у инвазивных штаммов и 36 (44%) — только у неинвазивных. Часть различий в распределении и частотах найденных сиквенс-типов представлена в **табл. 2**.

Несмотря на различия в составе и количестве найденных сиквенс-типов у исследованных инвазивных и неинвазивных штаммов, индекс разнообразия по Симпсону, рассчитанный согласно [13], не отличается и составляет 98,3 и 98,5% соответственно. С одной стороны, полученные высокие значения индекса разнообразия не позволяют говорить о выраженной клональной структуре исследованных возбудителей,

с другой — проведённый анализ данных МЛСТ методом BURST определяет две группы генетически близких штаммов с центральными сиквенс-типами ST-311 и ST-505 (при условии объединения в группу штаммов, имеющих не более 2 несовпадений в аллельном профиле). Группа ccST-311 объединяет 9 штаммов с сиквенс-типами ST-36, ST-42, ST-15248, ST-16095 и ST-16358, все они принадлежат серогруппе 23 (серотипы А или F). Группа ccST-505 объединяет 20 штаммов серотипа 3 с сиквенс-типами ST-180, ST-2049, ST-15250 и ST-15251, при этом инвазивные штаммы имеют сиквенс-тип ST-180, а неинвазивные — ST-505 (табл. 2). Группе ccST-505 соответствует обозначенная в исследовании [3] клональная группа CC180 — один из наиболее распространённых в России клональных комплексов *S. pneumoniae*, выделенных в 1980–2017 гг.

При сопоставлении найденных сиквенс-типов с сиквенс-типами 81 российского штамма *S. pneumoniae* (39 сиквенс-типов), выделенных от больных менингитом в 2011–2015 гг. и охарактеризованных в исследовании [10], найдено 12 совпадений, при этом различий в количестве совпадений между выборками инвазивных и неинвазивных штаммов не наблюдалось. Проведённый анализ по «основному геному» (cgMLST), включающий расчёт генетического расстояния по 1367 локусам, позволяет обозначить обособленные группы штаммов определённых серотипов (для наиболее распространённых серотипов: 3, 19F, 11A, 15BC и 9V), в то же время некоторые группы содержат штаммы нескольких серогрупп (например, 10A и 6C). Сопоставление результатов двух исследований и проведённая генетическая характеристика подтверждают сформулированные ранее положения об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными ПИ, на территории России [5].

Использование полногеномного секвенирования в молекулярно-биологическом мониторинге

Таблица 2. Сиквенс-типы инвазивных и неинвазивных штаммов, выявленные в 2 и более случаях

Table 2. Sequence types of invasive and non-invasive strains identified in 2 or more cases

Количество штаммов с совпадающим сиквенс-типом Number of strains with matching sequence-type	Инвазивные штаммы, 45 сиквенс-типов Invasive strains, 45 sequence-types (n = 68)	Неинвазивные штаммы, 54 сиквенс-типа Non-invasive strains, 54 sequence-types (n = 90)
6	180	—
5	—	81, 505
4	6202	1262
3	239, 505, 1025	62, 150, 143, 393, 423, 1025 , 1012, 9659, 11900
2	15, 225, 236, 311, 433 , 1262, 2361, 2991, 3544	42, 239, 433 , 2754, 6202 , 9248, 12493
Однократно Once	31 сиквенс-тип 31 sequence types	35 сиквенс-типов 35 sequence types

Примечание. *Жирным шрифтом выделены сиквенс-типы, найденные в обеих выборках.

Note. *Sequence types found in both samples are in bold.

возбудителей ПИ позволяет своевременно получать достоверные данные об изменениях в структуре циркулирующих серотипов *S. pneumoniae*, что может быть эффективно использовано при планировании и оценке эффективности иммунопрофилактических мероприятий. Основанная на полногеномных данных генетическая характеристика является эффективным инструментом внутривидовой классификации возбудителей, проводимой с целью расширенного микробиологического мониторинга как элемента эпидемиологического надзора за ПИ. Накопление и анализ полногеномных данных в перспективе позволит расширить представления об основных генетических вариациях, ассоциированных со способностью отдельных представителей вида *S. pneumoniae* вызывать инвазивные формы ПИ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Козлов Р.С. *Пневмококки: уроки прошлого — взгляд в будущее*. Смоленск; 2010.
2. Иванчик Н.В., Чагарян А.Н., Сухорукова М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В., Кречикова О.И. и др. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПЕГАС 2014–2017». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(3): 230–7. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237>
3. Цветкова И.А., Беланов С.С., Гостев В.В., Калиногорская О.С., Волкова М.О., Мохов А.С. и др. Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64(5-6): 22–31. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10027>
4. Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Кусева В.И., Шипулин Г.А. Методика ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(1): 41–8.
5. Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н. и др. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 113–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>
6. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000186. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>
7. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. *PeerJ*. 2016; 4: e2477. <https://doi.org/10.7717/peerj.2477>
8. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144(11): 3049–60. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
9. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.

- org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3: 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
10. Gladstone R.A., Lo S.W., Lees J.A., Croucher N.J., van Tonder A.J., Corander J., et al. International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact. *EBioMedicine*. 2019; 43: 338–46. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.021>
11. Ganaie F., Saad J.S., McGee L., van Tonder A.J., Bentley S.D., Lo S.W., et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. *mBio*. 2020; 11(3): e00937-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
12. Матосова С.В., Миронов К.О., Шипулина О.Ю., Нагибина М.В., Рыжов Г.Э., Венгеров Ю.Я. Характеристика серотипов *Streptococcus pneumoniae*, вызвавших гнойный бактериальный менингит на территории Москвы в период с 2016 по 2019 г. В кн.: *Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020»*. М.; 2020.
13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11): 2465–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>

REFERENCES

1. Kozlov R.S. *Pneumococci: Lessons from the Past — a Look into the Future [Pnevmokokki: uroki proshlogo – vzglyad v budushchee]*. Smolensk; 2010. (in Russian)
2. Ivanchik N.V., Chagaryan A.N., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S., Dekhnic A.V., Krechikova O.I., et al. Antimicrobial resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia: the results of multicenter epidemiological study «PEHASus 2014–2017». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(3): 230–7. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237> (in Russian)
3. Tsvetkova I.A., Belanov S.S., Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Volkova M.O., Mokhov A.S., et al. Clonality of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia, circulating from 1980 to 2017. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2019; 64(5-6): 22–31. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10027> (in Russian)
4. Mironov K.O., Platonov A.E., Dunaeva E.A., Kuseva V.I., Shipulin G.A. Real-time PCR procedure for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(1): 41–8. (in Russian)
5. Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhaylova Yu.V., Yanushevich Yu.G., Shelencov A.A., Chagaryan A.N., et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 113–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118> (in Russian)
6. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. *Microb. Genom.* 2018; 4(7): e000186. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>
7. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. *PeerJ*. 2016; 4: e2477. <https://doi.org/10.7717/peerj.2477>
8. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144(11): 3049–60. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>

9. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3: 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
10. Gladstone R.A., Lo S.W., Lees J.A., Croucher N.J., van Tonder A.J., Corander J., et al. International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact. *EBioMedicine.* 2019; 43: 338–46. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.021>
11. Ganaie F., Saad J.S., McGee L., van Tonder A.J., Bentley S.D., Lo S.W., et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. *mBio.* 2020; 11(3): e00937-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
12. Matosova S.V., Mironov K.O., Shipulina O.Yu., Nagibina M.V., Ryzhov G.E., Vengerov Yu.Ya. Serotype characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates caused meningitis in Moscow during 2016–2019 years. In: *Collection of Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation «Molecular Diagnostics and Biosafety-2020» [Sbornik materialov Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Molekulyarnaya diagnostika i biobezopasnost' – 2020»]*. Moscow; 2020. (in Russian)
13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11): 2465–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>

Информация об авторах

Миронов Константин Олегович[✉] — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4481-2249>

Гапонова Ирина Игоревна — лаборант-исследователь научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Корчагин Виталий Иванович — к.б.н., н.с. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

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

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

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

Чагарян Аида Нуримановна — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Иванчик Натали Владимировна — к.м.н., н.с. лаб. антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Козлов Роман Сергеевич — д.м.н., профессор, директор НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ, Смоленск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

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 18.03.2021;
принята к публикации 11.06.2021;
опубликована 04.10.2021

Information about the authors

Konstantin O. Mironov[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Group for the development of new methods for detecting genetic polymorphisms, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Irina I. Gaponova — research laboratory assistant, Scientific group for the development of new methods for detecting genetic polymorphisms, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Vitaly I. Korchagin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Scientific group for the development of new methods for detecting genetic polymorphisms, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

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

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

Valeriya V. Kaptelova — junior researcher, Scientific group of genomics and postgenomic technologies, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0952-0830>

Aida N. Chagaryan — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular diagnostics, Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Natali V. Ivanchik — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of antibiotic resistance, Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Roman S. Kozlov — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

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 18.03.2021;
accepted for publication 11.06.2021;
published 04.10.2021



Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β -пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья

Игнатьев Г.М.^{1✉}, Каа К.В.¹, Антонова Л.П.¹, Отрашевская Е.В.², Ишмухаметов А.А.¹

¹Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Случаи лихорадки Чикунгунья зарегистрированы более чем в 100 странах Европы, Океании, Африки, Азии, Карибского бассейна, Америки. Поражения скелетно-мышечной системы, характерные для лихорадки Чикунгунья, могут длиться от нескольких месяцев до года и даже приводить к утрате трудоспособности. Считается, что перенесённая инфекция обеспечивает пожизненный иммунитет. Этот фактор, наряду с отсутствием специфической терапии, делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики лихорадки Чикунгунья.

Целью настоящей работы было лабораторное изучение иммуногенных свойств препарата, содержащего инактивированный бета-пропиолактоном (β -ПЛ) антиген вируса Чикунгунья (ЧИКВ).

Материалы и методы. Очищенный инактивированный препарат с разными дозами антигена ЧИКВ был введён внутримышечно мышам BALB/c дважды с интервалом 14 сут. В динамике оценивали показатели гуморального и клеточного иммунитета в тестах ИФА, реакции нейтрализации и пролиферации спленоцитов.

Результаты. В ответ на введение инактивированного препарата антигена ЧИКВ наиболее выраженный иммунный ответ в ИФА и реакции нейтрализации отмечался для дозы 40 мкг. Стимуляция специфическим антигеном ЧИКВ вызывала выраженную пролиферацию спленоцитов иммунных животных. Максимальные показатели гуморального и клеточного иммунитета были отмечены у иммунизированных животных через 14 дней после 2-го введения препарата и сохранялись до конца срока наблюдения.

Обсуждение. Очищенный препарат, содержащий инактивированный β -ПЛ антиген ЧИКВ, обладал выраженными иммуногенными свойствами. Препарат, введённый мышам BALB/c двукратно с дозой инактивированного антигена ЧИКВ 40 мкг, вызывал формирование специфического гуморального иммунитета, характеризующегося появлением иммуноглобулинов класса G, обладающих вируснейтрализующей активностью, и формирование специфического клеточного ответа, характеризующегося пролиферацией спленоцитов в ответ на стимуляцию специфическим антигеном ЧИКВ.

Заключение. Очищенный инактивированный β -ПЛ препарат антигена ЧИКВ в дозе 40 мкг после двукратного введения мышам линии BALB/c продемонстрировал выраженную иммуногенность. Разработанный препарат может быть оценён как перспективный для профилактики лихорадки Чикунгунья с использованием дозы и схемы, апробированных в данном исследовании.

Ключевые слова: инактивированный антиген вируса Чикунгунья, мыши BALB/c, гуморальный и клеточный иммунитет

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 Федерального научного центра исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (протокол № 2/20 от 26.03.2020).

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: Игнатьев Г.М., Каа К.В., Антонова Л.П., Отрашевская Е.В., Ишмухаметов А.А. Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β -пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):519–527.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by β -propiolactone

Georgy M. Ignatyev^{1✉}, Konstantin V. Kaa¹, Lilia P. Antonova¹, Alena V. Atrasheuskaya², Aidar A. Ishmukhametov¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Cases of Chikungunya fever have been reported in more than 100 countries in Europe, Oceania, Africa, Asia, the Caribbean, and America. The musculoskeletal disorders typical for Chikungunya fever can last from several months to a year and even lead to disability. The infection is believed to provide lifelong immunity. This factor and the lack of specific therapy make vaccination the most promising method for preventing Chikungunya fever.

Materials and methods. The purified inactivated preparation with the different doses of the CHIKV antigen was injected intramuscularly to BALB/c mice twice with an interval of 14 days. Indicators of humoral and cellular immunity were assessed in dynamics in ELISA, the neutralization test and proliferation test of splenocytes.

Results. The purified preparation containing the CHIKV antigen inactivated by beta-propiolactone had pronounced immunogenic properties. The most prominent immune response in ELISA and neutralization test was registered for a dose of 40 μ g. Stimulation with the specific CHIKV antigen caused a pronounced proliferation of animals' splenocytes. The peak values of specific humoral and cellular immunity parameters were registered 14 days after the second injection.

Discussion. The purified preparation containing the CHIKV antigen inactivated by beta-propiolactone had demonstrated the sufficient immunogenic properties. The immunizing dose of 40 μ g CHIKV selected as a result of the studies caused in BALB/c mice the development of the humoral immunity characterized by the specific IgG with neutralizing activity, and the specific cell immunity characterized by the animals' splenocytes proliferation after stimulation with CHIKV antigen.

Conclusion. The purified β -PL inactivated preparation of the CHIKV antigen at a dose of 40 μ g to demonstrated pronounced immunogenicity in BALB/c mice after two-dose immunization. The developed preparation can be considered as promising for the prevention of Chikungunya fever using the dose and scheme tested in this study.

Keywords: *inactivated virus Chikungunya antigen, mice BALB/c, humoral and cell immunity*

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 Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS (protocol No. 2/20, 26.03.2020).

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: Ignatyev G.M., Kaa K.V., Antonova L.P., Atrasheuskaya A.V., Ishmukhametov A.A. Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by beta-propiolactone. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):519–527. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

Введение

Лихорадка Чикунгунья (ЛЧ) представляет собой космополитический арбовирус, передающийся преимущественно комарами из рода *Aedes* (*A. aegypti* и *A. albopictus*). Подавляющее количество случаев ЛЧ — симптоматические (75–95%) [1]. Типичными симптомами ЛЧ являются высокая температура и поражения скелетно-мышечной системы, которые могут длиться от нескольких месяцев до года и более с утратой трудоспособности. Летальность при ЛЧ невысокая, с преимущественной регистра-

цией среди новорождённых, престарелых, а также пациентов с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем [2].

Такие факторы, как глобальное потепление, вырубка лесов и урбанизация, ведут к росту распространения арбовирусных инфекций, в том числе ЛЧ [3]. В 2007 г. локальная передача инфекции была впервые отмечена в Европе, когда в ходе локализованной вспышки на северо-востоке Италии было выявлено 197 заболевших. Тем самым подтвердилась возможность вспышек заболеваний, передава-

емых комарами *A. albopictus*, на территории Европы [4, 5]. Случаи ЛЧ зарегистрированы более чем в 100 странах Европы, Океании, Африки, Азии, Карибского бассейна, Южной и Северной Америки [4, 5].

РНК вируса Чикунгунья (далее — ЧИКВ) достаточно консервативна. Циркулирующие генотипы ЧИКВ генетически близки и составляют единый серотип. Перекрестная защита между разными штаммами ЧИКВ, а также взаимная перекрестная защита среди других альфа-вирусов были продемонстрированы на животных моделях [6, 7]. Считается, что перенесённая инфекция ЧИКВ обеспечивает пожизненный иммунитет, повторные случаи инфицирования практически не регистрируются [8–10]. Этот фактор, наряду с отсутствием специфической терапии как самой инфекции, так и её последствий, делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики ЛЧ.

Впервые кандидатная вакцина для профилактики ЛЧ была разработана более 50 лет назад, когда V.R. Harrison и коллеги, используя инактивированный формалином штамм ЧИКВ 15561, получили специфический иммунный ответ у мышей и обезьян [11]. Для разработки профилактических вакцин против ЧИКВ используются разные технологические платформы. Вакцины на основе одного штамма ЧИКВ могут обеспечить длительную перекрестную защиту против гетерологичных штаммов вируса, что было продемонстрировано в экспериментах на мышах и макаках, несмотря на высокую вирулентность, проявленную некоторыми изолятами ЧИКВ [12].

Технология производства инактивированных вакцин является традиционной и успешной для большого количества вирусных вакцин. Данная технологическая платформа признана одной из наиболее безопасных [5], и разработка таких вакцин не требует генетических манипуляций с вирусом. Две формалин-инактивированные вакцины были разработаны с использованием разных штаммов ЧИКВ — азиатского 15561 и индийского DRDE-06, а также клеточной линии Vero и затем успешно прошли доклинические исследования на лабораторных животных, продемонстрировав свой иммуногенный потенциал [11, 13]. В относительно небольших сравнительных исследованиях на мышах линии BALB/c продемонстрировано преимущество инактивированного β -пропиолактоном (β -ПЛ) препарата антигена ЧИКВ над формалин-инактивированным препаратом в формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета [14]. Атенуированные вакцины, разработанные для профилактики ЛЧ, ранее продемонстрировали высокую реактогенность в клинических исследованиях, в том числе за счёт реверсии мутаций в гене E2 ЧИКВ [5].

Целью настоящей работы было изучение иммуногенных свойств препарата, содержащего инак-

тивированный β -ПЛ антиген штамма Nic ЧИКВ (GenBank асс. по MN271692). Данный штамм ЧИКВ был адаптирован к клеточной линии Vero, наработан и инактивирован с помощью β -ПЛ. Очищенный препарат был внутримышечно введён мышам дважды с интервалом 14 дней; показатели гуморального и клеточного иммунитета были оценены в динамике.

Материалы и методы

Вирус. В работе был использован штамм Nic ЧИКВ, полученный из рабочей коллекции вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. История выделения и пассирования штамма ЧИКВ описана ранее [15]. Нуклеотидная последовательность штамма ЧИКВ представлена в GenBank, асс.по MN271692.

Клетки. Клетки Vero (производственный банк клеток ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) культивировали в среде Игла MEM (производство ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) с 5% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота («Gibco»).

Лабораторные животные. В исследовании использовали мышей линии BALB/c (гаплотип H-2^d) обоего пола массой 12–14 г. Животные были получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА.

Препараты. Для получения инактивированного препарата ранее адаптированный штамм Nic ЧИКВ нарабатывали на клетках Vero при роллерном культивировании. Множественность заражения составляла 0,0001 ТЦД₅₀ на 1 клетку. Инактивацию ЧИКВ проводили β -ПЛ в соотношении 1 : 1000 в течение 48 ч при 5°C при постоянном перемешивании. Инактивированную вирусосодержащую жидкость концентрировали в 50 раз методом ультрафильтрации с помощью концентратора «Vivaflow 100» («Sartorius»). Полученный инактивированный вирусный концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на сорбенте «Sephacrose-6FF» («GE Healthcare»). Внутрипроизводственные контроли подтвердили стерильность препарата и отсутствие эндотоксинов. Содержание остаточной ДНК клеток Vero было менее 5 нг/мл, pH 7,4. Далее препарат инактивированного и очищенного антигена ЧИКВ был сорбирован на гидроксиде алюминия. Содержание гидроксида алюминия в конечной дозе препарата составляло 0,46 мкг на дозу. Инактивированный препарат ЧИКВ был произведён с разным содержанием антигена: 10, 25 и 40 мкг в одной дозе препарата. Однократно вводимый объём препарата составлял 0,5 мл.

Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения содержания антигена ЧИКВ проводили с помощью набора «БиоСкрин-Чикунгунья комплект G» («Биосервис») в соответствии с инструкцией производителя. Для калибровки использовали очищенный по описанной выше методике инак-

вирусовый ЧИКВ с известной концентрацией общего белка, который определяли по методу Лоури без осаждения в соответствии с ОФС «Определение белка» XIV Государственной фармакопеи РФ.

ИФА для определения титра антител ЧИКВ. Очищенный инактивированный антиген ЧИКВ сорбировали на 96-луночные планшеты в концентрации 100 нг на лунку в 0,01 М карбонат-гидрокарбонатном буфере с рН 9,6. Блокировку производили фосфатно-солевым буфером рН 7,2 с 1% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота («Gibco»). Перед проведением анализа образец сыворотки разводили 1 : 100 и далее шагом 2 — до 1 : 12 800. Инкубацию антигена с полученными сыворотками проводили при 37°C в течение 1 ч. Инкубацию со вторичным антивидовым НRP-конъюгатом проводили также при 37°C в течение 1 ч.

Иммунный комплекс выявляли с помощью готового субстрата ТМВ. Остановку реакции производили 2 М серной кислотой. Учёт реакции проводили при длине волны 450 нм. Каждое разведение сыворотки оценивали в 3 повторях.

Исследование пролиферативной активности спленоцитов. Оценку пролиферации спленоцитов осуществляли фотометрическим методом по ранее описанной методике [16]. Стоковый раствор PMS («Sigma»), приготовленный на фосфатно-солевом буфере (40 мкг/мл), длительное время хранился при –20°C в защищённом от света месте. Приготовление стокового раствора ХТТ («Sigma») на фосфатно-солевом буфере (1,25 мг/мл) проводили непосредственно перед использованием. Готовую смесь реагентов (ХТТ : PMS = 4 : 1) стерилизовали пропусканием через фильтр «Millex» (0,22 мкм, «Millipore») и добавляли в лунки (50 мкл/лунку) за 8 ч до окончания периода инкубации.

Оптическую плотность (ОП) регистрировали при длине волны 450 нм против контрольной длины волны 630 нм.

Результат теста рассчитывали по формуле:

$$ИС = ОП_C / ОП_K,$$

где ИС — индекс стимуляции; ОП_С — ОП в лунке со стимулированными спленоцитами; ОП_К — ОП в контрольных лунках.

При изучении клеточного иммунитета использовали следующие антигены: антиген ЧИКВ, инактивированный β-ПЛ (5 мкг/мл); антиген вируса SARS-CoV-2 — штамм Aydar-1, инактивированный β-ПЛ (5 мкг/мл), а также митогены: конканавалин А (КонА, «ICN», 5 мкг/мл) и липополисахарид *Salmonella typhimurium* (ЛПС, «Sigma», 5 мкг/мл). Каждый антиген и митоген использовали для стимуляции спленоцитов животных в 4 повторях.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили по ранее описанной методике [13] на 96-луночных планшетах с использованием культуры клеток Vero

и того же штамма ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀. Полученный результат переводили в log₂ для статистической обработки.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения среднего. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Дизайн исследования. Животные были разделены на группы по 25 мышей в каждой:

- группа А — иммунизированы внутримышечно препаратом в дозе 10 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа В — иммунизированы внутримышечно препаратом в дозе 25 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа С — иммунизированы внутримышечно препаратом в дозе 40 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа D — контрольные животные, иммунизированные внутримышечно препаратом гидроксида алюминия в дозе 0,46 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента.

Иммунизацию животных проводили внутримышечно (бедренная мышца), разделив 1 дозу на 2 введения, по 0,25 мл препарата в каждую конечность. У животных всех групп до проведения 1-й иммунизации (0-е сутки), до проведения 2-й иммунизации (на 14-е сутки), а также на 21, 28 и 35-е сутки эксперимента (7, 14 и 21-е сутки после 2-й иммунизации соответственно) производили забор крови из глазной вены. Кровь пулировали, после центрифугирования разливали по пробиркам в объёме 200 мкл и хранили при –70°C для последующего одномоментного исследования. Во всех группах на каждую точку забора крови использовали 4 животных.

У животных групп С и D одновременно со взятием крови выделяли селезёнку для дальнейшего получения суспензии спленоцитов.

Все процедуры на отдельных мышах проводили вне визуального, аудиального или обонятельного контакта с другими животными. Работу с животными проводили в соответствии с международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS № 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Результаты

Доза препарата, содержащего 10 мкг антигена ЧИКВ, вызывала незначительный подъём специфици-

ческих антител в группе А после 2-й иммунизации с падением к 35-м суткам наблюдения (табл. 1). Введение дозы препарата, содержащего 25 мкг антигена ЧИКВ, привело к формированию достаточно высокого уровня специфических антител в группе В на 14-е сутки после 2-й иммунизации, который, однако, также снизился к 35-м суткам наблюдения (табл. 1). В сыворотке животных группы С, привитых дважды дозой 40 мкг антигена ЧИКВ, уже через 7 сут отмечался подъём специфических IgG, превосходящий максимальные значения IgG в группах А и В. Максимальный титр специфических IgG в сыворотке животных группы С превосходил таковые в группе А в 16 раз и в группе В — в 4 раза. Максимальные титры специфических IgG сохранялись у животных группы С до конца срока наблюдения.

В сыворотке животных группы А вируснейтрализующие IgG были зарегистрированы однократно на 14-е сутки после 2-й иммунизации (табл. 2). Показатели вируснейтрализующих антител, сформировавшихся у животных группы В на введение препарата, содержащего 25 мкг антигена ЧИКВ, на все сроки наблюдения были достоверно выше таковых ($p < 0,05$) в группе А и достоверно ниже ($p < 0,05$) показателей, сформировавшихся на введение препарата, содержащего 40 мкг антигена ЧИКВ в группе С (табл. 2). Максимальный уровень вируснейтрализующих IgG в группе В отмечался аналогично титрам в ИФА через 14 сут после 2-й иммунизации с дальнейшим падением. В ответ на введение инактивированного препарата с разным содержанием

антигена ЧИКВ наиболее выраженный иммунный ответ, как и в ИФА, отмечался для дозы антигена ЧИКВ 40 мкг/0,5 мл. В группе С максимальный прирост специфических антител был на 14-е сутки после 2-го введения препарата и сохранялся до конца срока наблюдения.

У животных контрольной группы D специфические IgG в ИФА и РН не выявлялись в сыворотке ни в одной из контрольных точек (данные не приведены).

Для дальнейших исследований клеточного иммунного ответа был выбран препарат с дозой антигена ЧИКВ 40 мкг как обеспечивший наиболее выраженный и стабильный гуморальный иммунный ответ у мышей линии BALB/c после двукратной иммунизации.

Влияние иммунизации инактивированным препаратом антигена ЧИКВ на функциональное состояние лимфоцитов (спленоцитов) мышей BALB/c и, соответственно, на формирование специфического клеточного ответа оценивали в реакции пролиферации спленоцитов. Как следует из представленных в табл. 3 данных, использованные в реакции вирусные антигены, специфический ЧИКВ и гетерологичный SARS-CoV-2 *in vitro* не вызывали подавления пролиферации спленоцитов на 0-е сутки у животных в группе С и в контрольной группе D (табл. 3).

Пролиферативная реакция спленоцитов животных обеих групп на стимуляцию *in vitro* митогенами КонА и ЛПС была достаточно выраженной и достоверно превосходила таковую при использова-

Таблица 1. Титр специфических антител в сыворотке мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ в динамике

Table 1. Dynamic changes in specific IgG titers in sera of BALB/c mice immunized with the preparation with different concentration of CHIKV antigen

Группа / Group	ИФА IgG, титр / ELISA IgG, titer			
	14-е сутки / day 14	21-е сутки / day 21	28-е сутки / day 28	35-е сутки / day 35
A	1 : 200	1 : 400	1 : 400	1 : 200
B	1 : 200	1 : 800	1 : 1600	1 : 800
C	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400

Таблица 2. Показатели вируснейтрализующих антител в сыворотке мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ, в динамике ($M \pm SD$)

Table 2. Dynamic changes in virus-neutralizing antibodies in sera of BALB/c mice immunized with the preparation with different concentration of CHIKV antigen ($M \pm SD$)

Группа / Group	РН, \log_2 / Neutralization test, \log_2			
	14-е сутки / day 14	21-е сутки / day 21	28-е сутки / day 28	35-е сутки / day 35
A	2,19 \pm 0,19	2,30 \pm 0,19	3,10 \pm 0,07	2,21 \pm 0,10
B	3,10 \pm 0,07	3,30 \pm 0,23	4,17 \pm 0,15*	3,45 \pm 0,15
C	4,84 \pm 0,14	5,50 \pm 0,15	6,84 \pm 0,31**	6,84 \pm 0,31**

Примечание. * $p < 0,05$ относительно исходных показателей на 0-е сутки; ** $p < 0,05$ относительно аналогичных показателей в группе В.
Note. * $p < 0.05$ in comparison with day 0; ** $p < 0.05$ in comparison to those in group B.

Таблица 3. Динамика пролиферативной активности спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ ($M \pm SD$)**Table 3.** Proliferative activity of splenocytes from BALB/c mice immunized with the preparation contained different CHIKV antigen dose ($M \pm SD$)

Группа Group	Антиген Antigen	ИС спленоцитов / Splenocytes stimulation index				
		0-е сутки / day 0	14-е сутки / day 14	21-е сутки / day 21	28-е сутки / day 28	35-е сутки / day 35
С	ЧИКВ / CHIKV	1,04±0,08	1,30±0,10 [#]	1,58±0,10 [#]	1,66±0,12 [#]	1,60±0,10 [#]
	SARS-CoV-2	1,02 ± 0,08	1,03 ± 0,10	1,02 ± 0,08	1,04 ± 0,10	1,02±0,08
	КонА / ConA	3,60 ± 0,12	3,50 ± 0,14	3,56 ± 0,12	3,50 ± 0,14	3,60±0,12
	ЛПС / LPS	1.85 ± 0,10	1.90 ± 0,10	1,85 ± 0,10	1,90 ± 0,10	1,85±0,10
D	ЧИКВ / CHIKV	1,02 ± 0,08	1,08 ± 0,10	1,08 ± 0,10	1,06 ± 0,10	1,04±0,08
	SARS-CoV-2	1,02 ± 0,08	1,04 ± 0,08	1,02 ± 0,10	1,04 ± 0,08	1,02±0,08
	КонА / ConA	3,56 ± 0,12	3,65 ± 0,14	3,60 ± 0,12	3,50 ± 0,14	3,50±0,12
	ЛПС / LPS	1.80 ± 0,10	1.90 ± 0,10	1.85 ± 0,10	1.90 ± 0,10	1.80±0,10

Примечание. На 14-е сутки после забора крови у 4 животных все оставшиеся животные были иммунизированы дважды. [#] $p < 0,05$ относительно исходных показателей на 0-е сутки; $p < 0,05$ относительно аналогичных показателей в группе D.

Note. On day 14 after blood sampling from 4 mice all other animals were inoculated twice. [#] $p < 0.05$ in comparison with day 0; [#] $p < 0.05$ in comparison to those in group D.

нии вирусных антигенов на все сроки наблюдения ($p < 0,05$).

Спленоциты неиммунных животных группы D отвечали выраженной пролиферацией на стимуляцию *in vitro* только митогенами Т- и В-клеток (КонА и ЛПС), но не пролиферировали при стимуляции вирусными антигенами — как антигеном ЧИКВ, так и антигеном SARS-CoV-2 на все сроки наблюдения (табл. 3).

Как следует из представленных в табл. 3 данных, спленоциты мышей BALB/c, иммунизированных инактивированным препаратом ЧИКВ в группе С, отвечали на стимуляцию *in vitro* специфическим антигеном ЧИКВ, начиная с 14-х суток после 1-й иммунизации. Результаты, полученные на 14-е сутки, свидетельствуют о том, что после однократной иммунизации ИС спленоцитов достоверно превосходит этот же показатель на 0-е сутки ($p < 0,05$). На 21, 28 и 35-е сутки эксперимента у иммунизированных животных ИС спленоцитов на антиген ЧИКВ достоверно превосходит аналогичный показатель на 14-е сутки после 1-й иммунизации ($p < 0,05$). ИС спленоцитов в ответ на стимуляцию антигеном ЧИКВ у животных группы С после 2-й иммунизации достиг максимума на 28-е сутки эксперимента. Статистически достоверная разница между ИС спленоцитов антигеном ЧИКВ у животных групп С и D на всём сроке наблюдения свидетельствует о специфичности пролиферативной реакции спленоцитов у иммунных животных.

Обсуждение

Консервативность вирусной РНК ЧИКВ, перекрёстная защита между разными штаммами ЧИКВ, пожизненный иммунитет и практическое отсутствие повторных случаев инфицирования [8–10],

а также отсутствие специфической терапии как самой инфекции, так и её последствий делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики ЛЧ.

Два основных вида традиционных вакцин — инактивированные и аттенуированные — имеют преимущество с точки зрения экономической эффективности и устоявшихся нормативных стандартов. Эти преимущества упрощают исследования и разработку технологии, а также лицензирование для удовлетворения спроса и профилактики заболевания. Главным преимуществом инактивированных вакцин являются их безопасность при отсутствии риска реверсии вирулентности, стабильность и минимальные проблемы хранения и транспортировки. Определённым недостатком является необходимость многократных бустерных доз для выработки и поддержания эффективного иммунного ответа.

Для производства цельновирионных инактивированных вакцин используются различные технологии инаktivации вирусов, такие как ультрафиолетовое облучение, формалин или β-ПЛ.

Известно, что инаktivация вируса формалином происходит за счёт моногидроксиметилирования аденина, сшивания белков путём образования интер- и внутримолекулярных метиленовых мостиков, а также сшивания РНК вируса с белками капсида, а также сшивания РНК вируса с белками капсида, что приводит к блокировке чтения генома. Таким образом, формальдегид может нарушать структуру вируса и приводить к низкой иммуногенности некоторых вирусных вакцин [17]. Тем не менее предыдущие исследования формалин-инактивированных вакцин для профилактики ЛЧ [13, 14] показали их достаточный иммуногенный потенциал, продемонстрировав выработку специфических вируснейтрализующих антител [11, 13, 14], а также

развитие клеточного иммунитета [13] в доклинических исследованиях. Клеточный иммунитет при ЛЧ остаётся малоизученным, однако доказана его критическая роль для контроля и клиренса ЧИКВ [18].

β -ПЛ широко используется для инактивации вирусов, как например, в вакцинах для профилактики бешенства, гриппа, желтой лихорадки и коронавируса, в основном действуя как алкилирующий агент на гуанин вирусной ДНК или РНК [19]. Свойство β -ПЛ алкилировать преимущественно вирусный геном способствует развитию протективного иммунного ответа на ведение вакцины [17]. Однако полностью исключить модификацию вирусных белков при воздействии β -ПЛ нельзя. Как показало проведённое ранее исследование, количество и характер модификаций вирусных компонентов, как белков, так и ДНК или РНК, зависят от концентрации β -ПЛ, типа буфера, pH, а также внутренней реакционной способности отдельных нуклеофильных групп [19]. Таким образом, условия инактивации вируса β -ПЛ при производстве вакцины должны быть максимально оптимизированы, чтобы, с одной стороны, добиться полной инактивации вируса, а с другой — устойчиво высокой иммуногенности вакцины.

В данном исследовании продемонстрирована иммуногенность инактивированного β -ПЛ препарата для профилактики ЛЧ. Максимальный прирост специфических антител наблюдался у привитых животных всех экспериментальных групп через 14 сут после 2-го введения. Специфические вируснейтрализующие антитела сохранялись у животных экспериментальных групп до конца срока наблюдения. Наилучший результат со стороны гуморального иммунитета, как в реакции ИФА, так и в РН, зарегистрирован после иммунизации животных препаратом, содержащим 40 мкг антигена ЧИКВ. В группе животных, привитых препаратом, содержащим 40 мкг в дозе, максимальные показатели гуморального иммунитета сохранялись до конца срока наблюдения. В то же время в группах животных, привитых меньшими дозами (10 и 25 мкг) антигена ЧИКВ, показатели гуморального иммунитета снижались к 21-м суткам после 2-й иммунизации.

Результаты исследования пролиферации спленоцитов иммунных животных позволяют сделать заключение, что при иммунизации препаратом, содержащим разные дозы инактивированного антигена ЧИКВ, у мышей BALB/c формировался клон клеток памяти, которые при повторной встрече со специфическим антигеном реагировали выраженной пролиферацией. Результаты исследования пролиферации спленоцитов иммунных лабораторных животных в ответ на стимуляцию специфическим антигеном ЧИКВ *in vitro* продемонстрировали результаты, сходные с результатами исследования показателей гуморального иммунитета в ИФА и РН. Максимальный прирост ИС спленоцитов *in vitro* наблюдался у при-

витых животных через 14 сут после 2-го введения препарата и сохранялся до конца срока наблюдения в группе животных, привитых препаратом, содержащим 40 мкг антигена ЧИКВ в дозе 0,5 мл.

Препарат инактивированного β -ПЛ ЧИКВ, наработанного на производственном банке клеток Vero, аттестованном в соответствии с ОФС «Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических препаратов» XIV Государственной Фармакопеи РФ, с гидроокисью алюминия в качестве адьюванта продемонстрировал выраженные иммуногенные свойства при двукратном введении мышам BALB/c. β -ПЛ имеет очевидные преимущества перед формалином, в том числе в формировании более выраженного специфического поствакцинального гуморального и клеточного иммунитета при использовании для инактивации ЧИКВ [14]. Учитывая быстрый рост адаптированного к клеткам Vero ЧИКВ, данная технологическая платформа позволяет производителю, использующему клетки Vero для производства других инактивированных вирусных вакцин, достаточно быстро произвести вакцину для профилактики ЛЧ. Таким образом, полученные в представленной работе результаты позволяют оценить инактивированный препарат антигена ЧИКВ в дозе 40 мкг/0,5 мл как перспективный.

Заключение

Очищенный инактивированный β -ПЛ препарат антигена ЧИКВ продемонстрировал выраженный иммуногенный потенциал. Выбранная в результате исследований иммунизирующая доза антигена ЧИКВ 40 мкг/0,5 мл при двукратном введении мышам линии BALB/c вызывает формирование как специфического гуморального иммунитета, характеризующегося появлением IgG, обладающих вируснейтрализующей активностью, так и специфического клеточного иммунного ответа, характеризующегося выраженной пролиферацией спленоцитов при стимуляции специфическим антигеном ЧИКВ *in vitro*.

Представленные результаты позволяют оценить препарат как перспективный для профилактики ЛЧ с использованием дозы и схемы, апробированных в данном исследовании.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Weaver S.C., Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13): 1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>
2. Simon F., Javelle E., Cabie A., Bouquillard E., Troisgros O., Gentile G., et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). *Med. Mal. Infect.* 2015; 45(7): 243–63. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>
3. Schrauf S., Tschismarov R., Tauber E., Ramsauer K. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika

- and Chikungunya infections. *Front. Immunol.* 2020; (11): 592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00592>
4. Reyes-Sandoval A. 51 years in of Chikungunya clinical vaccine development: A historical perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2351–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1574149>
 5. Erasmus J.H., Rossi S.L., Weaver S.C. Development of vaccines for Chikungunya fever. *J. Inf. Dis.* 2016; 214(S5): S488–96. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
 6. Porterfield J.S. Cross-neutralization studies with group A arthropod-borne viruses. *Bull. WHO.* 1961; 24(6): 735–41.
 7. Hearn H.J., Rainey C.T. Cross protection in animals infected with group A arboviruses. *J. Immunol.* 1963; 90: 720–4.
 8. Powers A.M., Brault A.C., Tesh R.B., Weaver S.C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 1): 471–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
 9. Galatas B., Ly S., Duong V., Baisley K., Nguon K., Chan S., et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian Rural Community, April (2012). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(1): e0004281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
 10. Pierro A., Rossini G., Gaibani P., Finarelli A.C., Moro M.L., Landini M.P., et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. *New Microbes New Infect.* 2015; 7: 23–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.04.002>
 11. Harrison V.R., Eckels K.H., Bartelloni P.J., Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed chikungunya vaccine. *J. Immunol.* 1971; (107): 643–6.
 12. Langsjoen R.M., Haller S.L., Roy C.J., Vinet-Oliphant H., Bergen N.A., Erasmus J.H., et al. Chikungunya virus strains show lineage-specific variations in virulence and cross-protective ability in murine and nonhuman primate models. *mBio.* 2018; 9(2): e02449-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02449-17>
 13. Tiwari M., Parida M., Santhosh S.R., Khan M., Dash P.K., Rao P.V. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine.* 2009; 27(18): 2513–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>
 14. Kumar M., Sudeep A.B., Arankalle V.A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. *Vaccine.* 2012; 30(43): 6142–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.072>
 15. Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С., Антонова Л.П., Самарцева Т.Г., Мефед К.М. и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(3): 227–32. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
 16. Mayer U.B., Haller C., Haidinger W., Atrasheuskaya A., Bukin E., Lubitz W., et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* 2005; (8): 4810–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4810-4817.2005>
 17. Delrue I., Verzele D., Maddar A., Nauwynck J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
 18. Davenport B.J., Bullock C., McCarthy M.K., Hawman D.W., Murphy K.M., Kedl R.M., et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J. Virol.* 2020; (94): e02036-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
 19. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>

REFERENCES

1. Weaver S.C., Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13): 1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>
2. Simon F., Javelle E., Cabie A., Bouquillard E., Troisgros O., Gentile G., et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). *Med. Mal. Infect.* 2015; 45(7): 243–63. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>
3. Schrauf S., Tschismarov R., Tauber E., Ramsauer K. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika and Chikungunya infections. *Front. Immunol.* 2020; (11): 592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00592>
4. Reyes-Sandoval A. 51 years in of Chikungunya clinical vaccine development: A historical perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2351–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1574149>
5. Erasmus J.H., Rossi S.L., Weaver S.C. Development of vaccines for Chikungunya fever. *J. Inf. Dis.* 2016; 214(S5): S488–96. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
6. Porterfield J.S. Cross-neutralization studies with group A arthropod-borne viruses. *Bull. WHO.* 1961; 24(6): 735–41.
7. Hearn H.J., Rainey C.T. Cross protection in animals infected with group A arboviruses. *J. Immunol.* 1963; 90: 720–4.
8. Powers A.M., Brault A.C., Tesh R.B., Weaver S.C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 1): 471–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
9. Galatas B., Ly S., Duong V., Baisley K., Nguon K., Chan S., et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian Rural Community, April (2012). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(1): e0004281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
10. Pierro A., Rossini G., Gaibani P., Finarelli A.C., Moro M.L., Landini M.P., et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. *New Microbes New Infect.* 2015; 7: 23–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.04.002>
11. Harrison V.R., Eckels K.H., Bartelloni P.J., Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed chikungunya vaccine. *J. Immunol.* 1971; (107): 643–6.
12. Langsjoen R.M., Haller S.L., Roy C.J., Vinet-Oliphant H., Bergen N.A., Erasmus J.H., et al. Chikungunya virus strains show lineage-specific variations in virulence and cross-protective ability in murine and nonhuman primate models. *mBio.* 2018; 9(2): e02449-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02449-17>
13. Tiwari M., Parida M., Santhosh S.R., Khan M., Dash P.K., Rao P.V. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine.* 2009; 27(18): 2513–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>
14. Kumar M., Sudeep A.B., Arankalle V.A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. *Vaccine.* 2012; 30(43): 6142–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.072>
15. Ignat'ev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S., Antonova L.P., Samartseva T.G., Mefed K.M., et al. Indication and identification of dengue and chikungunya viruses in *Aedes* spp. Mosquitoes captured in Central America. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(3): 227–32. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> (in Russian)

16. Mayer U.B., Haller C., Haidinger W., Atrasheuskaya A., Bukin E., Lubitz W., et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* 2005; (8): 4810–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4810-4817.2005>
17. Delrue I., Verzele D., Madder A., Nauwynck J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
18. Davenport B.J., Bullock C., McCarthy M.K., Hawman D.W., Murphy K.M., Kedl R.M., et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J. Virol.* 2020; (94): e02036-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
19. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>

Информация об авторах

Игнатъев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., профессор, зам. руководителя направления по качеству и инновационным разработкам ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Каа Константин Владимирович — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

Антонова Лилия Петровна — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>

Отрашевская Елена Викторовна — главный специалист отдела научных исследований и опытно-конструкторских работ СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Ишмухаметов Айдар Айратович — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

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 28.04.2021;
принята к публикации 22.07.2021;
опубликована 18.10.2021

Information about the authors

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Deputy Head, Department for quality and innovative development, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Konstantin V. Kaa — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

Lilia P. Antonova — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>

Alena V. Atrasheuskaya — senior specialist, R&D Department, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Aidar A. Ishmukhametov — D. Sci. (Med.), Professor, General Director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

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 28.04.2021;
accepted for publication 22.07.2021;
published 18.10.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-107>

Микробиота нижних дыхательных путей при внебольничных пневмониях, в том числе ассоциированных с SARS-CoV-2

Катаева Л.В.✉, Вакарина А.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б.

Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии, Тюмень, Россия

Аннотация

Введение. Многие аспекты патогенеза и патоморфологии коронавирусной пневмонии нуждаются во всестороннем комплексном изучении с использованием современных методов диагностики.

Цель исследования — изучение микробиоты нижних дыхательных путей при внебольничных пневмониях (ВБП), ассоциированных с SARS-CoV-2, оценка антибиотико- и фагорезистентности циркулирующих штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы. Проведён анализ биопроб от 486 пациентов, находящихся на стационарном лечении в 5 моногоспиталях Тюмени и Тюменской области с диагнозом ВБП средней и тяжёлой степени. Почти в 90% случаев пациенты получали оксигенотерапию, около 8% больных были подключены к аппаратам искусственной вентиляции лёгких. Посев клинического материала осуществлялся на протяжении 6 мес (с апреля по октябрь 2020 г.). Идентификацию выделенных штаммов бактерий выполняли методом масс-спектрометрии. У обнаруженных изолятов определяли резистентность к антимикробным препаратам и бактериофагам.

Результаты. В микробиоте нижних дыхательных путей пациентов с диагнозом «ВБП, ассоциированная с SARS-CoV-2» преобладали грамположительные кокки, преимущественно условно-патогенные микроорганизмы рода *Streptococcus* и грибы рода *Candida*. При этом бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующие грамотрицательные бактерии встречались реже, чем у пациентов без COVID-19. В структуре патогенов лидирующее положение занимали бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter* spp. Анализ чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам показал наиболее высокую резистентность у штаммов *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. Установлено, что в группе пациентов с ВБП, ассоциированной с SARS-CoV-2, шансы встретить штаммы *Streptococcus* spp. с высокой устойчивостью к антибиотикам в 1,5 раза выше, а с учётом 95% доверительного интервала величина этого показателя колебалась в пределах 1,1–2,1 раза.

Вывод. Полученные данные свидетельствуют о том, что микробиота нижних дыхательных путей при ВБП, ассоциированных с SARS-CoV-2, представлена преимущественно бактериями рода *Streptococcus*, обладающими высоким уровнем резистентности к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, внебольничная пневмония, COVID-19, SARS-CoV-2, штаммы бактерий, мокрота, промывные воды бронхов, бронхоальвеолярный лаваж

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии (протокол № 2 от 20.03.2020).

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: Катаева Л.В., Вакарина А.А., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б. Микробиота нижних дыхательных путей при внебольничных пневмониях, в том числе ассоциированных с SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):528–537.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-107>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-107>

Microbiota of the lower respiratory tract in community-acquired pneumonia, including cases associated with SARS-CoV-2

Lyubov V. Kataeva✉, Arina A. Vakarina, Tatiana F. Stepanova, Kseniya B. Stepanova

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia

Abstract

Introduction. Many aspects of the pathogenesis and pathomorphology of pneumonia associated with novel coronavirus require a comprehensive study using modern diagnostic methods.

The **aim** of the study was to study the microbiota of the lower respiratory tract in community-acquired pneumonia associated with SARS-CoV-2, to assess the antibiotic and phage resistance of circulating strains of microorganisms.

Materials and methods. The analysis of biosamples from 486 patients undergoing inpatient treatment in five mono-hospitals in Tyumen and Tyumen region with a diagnosis of moderate and severe community-acquired pneumonia was carried out. In almost 90% of cases patients received oxygen therapy, about 8% of patients were connected to ventilators. The inoculation of the cultures with clinical samples was carried out for six months (from April to October 2020). The isolated bacterial strains were identified by mass spectrometry. The resistance to antimicrobial drugs and bacteriophages was assessed for identified isolated.

Results. Gram-positive cocci, mainly opportunistic microorganisms of the genus *Streptococcus* and *Candida fungi* predominated in the microbiota of the lower respiratory tract of patients diagnosed with community-acquired pneumonia associated with SARS-CoV-2. At the same time, bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and non-fermenting gram-negative bacteria were less common compared to patients without coronavirus infection. In the structure of pathogens, the leading position was occupied by the bacteria *K. pneumoniae* and *Acinetobacter* spp. The analysis of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs showed the highest resistance rates in strains of *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Coagulase-negative Staphylococcus*. It has been established that in the group of patients with community-acquired pneumonia associated with SARS-CoV-2, the risk of infection with *Streptococcus* spp. with high level of antibiotic resistance was 1.5 times higher, and taking into account the 95% confidence interval, the value of this indicator ranged from 1.1 to 2.1 times.

Conclusion. The data obtained indicate that the microbiota of the lower respiratory tract in community-acquired pneumonia associated with SARS-CoV-2 is represented mainly by bacteria of the genus *Streptococcus*, which have a high level of resistance to antimicrobial drugs.

Keywords: antibiotic resistance, community-acquired pneumonia, SARS-CoV-2, bacterial strains, sputum, bronchial lavage water, bronchoalveolar lavage

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Tyumen Region Infection Pathology Research Institute (protocol No. 2, 20.03.2020).

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: Kataeva L.V., Vakarina A.A., Stepanova T.F., Stepanova K.B. Microbiota of the lower respiratory tract in community-acquired pneumonia, including cases associated with SARS-CoV-2. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):528–537.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-107>

Введение

Микробиота лёгких функционирует в здоровой лёгочной ткани и оказывает влияние на иммунный ответ при физиологических и патологических состояниях. Незначительная численность микрофлоры лёгких затрудняет выделение, культивирование и идентификацию функциональных микробов. Тем не менее низкая биомасса не подрывает её потенциальную роль в формировании местного иммунитета лёгких [1].

Постоянство лёгочного микробиома определяется балансом 3 факторов: поступлением микробов в респираторные пути в процессе вдыхания; удалением микробов из дыхательных путей с кашлем; коэффициентом колонизации микробов. Местные условия в лёгких во время болезни резко меняются, запуская механизм избирательного размножения бактерий. Признанный феномен бактериальной колонизации на поздних стадиях заболеваний лёгких объясняет преимущественный рост видов бактерий, адаптированных к конкретным условиям. Установлена и экспериментально подтверждена распространённость субклинических микроаспираций фарингеальных секретов у здоровых людей.

Показано, что структура микробиома лёгких более сходна с микробиомом ротоглоточной слизи, чем носоглоточной. Имеются доказательства того, что бактериальные сообщества нижних дыхательных путей (НДП) могут играть определённую роль в патогенезе и прогрессировании интерстициальных болезней лёгких.

Установлено, что микробиом здоровых лёгких представлен бактериями *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Наиболее часто бронхиальное дерево колонизируют бактерии рода *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Megasphaera* и *Sphingomonas*. Изучение взаимодействия вирусов и бактерий в лёгких на уровне сообщества ещё находится в начале пути [2].

Внебольничные пневмонии (ВБП) являются серьёзной проблемой инфекционной патологии человека и одной из ведущих причин смерти [3]. По данным литературы, этиология ВБП установлена в 88,5% случаев методом ПЦР. Ведущими возбудителями указаны *S. pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, которые были выявлены в 86,3 и 41,2% случаев соответственно. В число актуальных патогенов ВБП вошли *Mycoplasma pneumoniae* (23,6%),

Adenovirus (14,9%). *Chlamydomphila pneumoniae* обнаруживается значительно реже (6,7%) [4]. Несмотря на то что в популяции 1–6% населения являются носителями *Klebsiella pneumoniae*, локализованной в носоглотке, и 5–38% — в кишечнике, у госпитализированных пациентов носительство *K. pneumoniae* составляет 23% [5]. Указывается, что представители группы *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*) являются маркером прогностически неблагоприятного течения процесса в лёгких [6]. Информация по возбудителям бактериальных пневмоний свидетельствует о полимикробной этиологии и сочетании большого числа ассоциаций микроорганизмов и вирусов [4, 7].

На сегодняшний день пандемия COVID-19 по праву считается главной чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения за столетие. У значительной части пациентов развивается пневмония, требующая госпитализации или прогрессирующая до манифестации респираторных осложнений [8]. SARS-CoV-2 становится исключительно опасным, если вторичная бактериальная пневмония поражает пациента с COVID-19 в качестве осложнения. Существенную часть тяжёлых течений инфекции и смертности, связанных с коронавирусом в России в марте–мае 2020 г., можно отнести на счёт вторичной бактериальной пневмонии и, в гораздо меньшей степени, сопутствующих вирусных инфекций [9].

Анализ результатов лабораторных исследований пациентов с ВБП, ассоциированными с COVID-19, представленных в научных изданиях указывает на различную частоту присоединения вторичных инфекций (0–54%) [3, 10–13]. В зарегистрированных осложнениях, обусловленных сопутствующими коинфекциями, этиологические агенты включали *M. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *S. pneumoniae* и *K. pneumoniae*. По данным М.В. Стуловой и соавт., к наиболее часто встречающимся бактериальным возбудителям относятся *S. pneumoniae* (70%), *S. agalactiae* (10%), *S. pneumoniae* в ассоциации с *Staphylococcus aureus* (6,6%) и *Pseudomonas aeruginosa* (13,3%) [8]. В исследованиях Е. Sharifpour и соавт. у пациентов с COVID-19 в 90% случаев идентифицированы бактерии *Acinetobacter baumannii* и в 10% — *S. aureus*, все штаммы *A. baumannii* оказались устойчивыми к антибиотикам [14]. По результатам изучения микробиоты пациентов в Ростовской области наиболее частым этиологическим агентом ВБП бактериальной природы явились бактерии рода *Streptococcus*. В исследовании N. Chen и соавт. только 4% госпитализируемых имели сопутствующие грибковые инфекции, представленные *Candida albicans* и *C. glabrata* [15]. Следует отметить, что идентификация патогенов является сложной задачей в странах с низким и средним уровнем доходов, поскольку отсутствуют легкодоступные и рентабельные клини-

ческие или биологические маркёры, которые могли бы эффективно различать бактериальные и вирусные инфекции [10].

Остаются нерешёнными вопросы о синергических взаимодействиях между вирусом SARS-CoV-2 и некоторыми сопутствующими бактериями, о влиянии на тяжесть заболевания коинфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериями [16]. В числе механизмов взаимодействия коинфицирующих агентов особое внимание уделяется влиянию вирусов на токсинообразование бактерий, а бактерий — на инфекционность вирусов. Коинфицирующие микроорганизмы способствуют сочетанному преодолению ими эпителиального барьера, могут взаимовыгодно модифицировать функции клеток иммунной системы и способствовать ускользанию этих патогенов от иммунного ответа. Показано, что разнообразие бактериально-вирусных взаимодействий при коинфицировании не только вызывает необходимость новых подходов к их своевременному распознаванию и контролю, но и порождает новые биотехнологии и стратегии борьбы с коинфицированием, развитию которых во всём мире уделяется огромное внимание [17].

В настоящее время распространение антибиотикорезистентности приняло глобальный характер [16, 18]. Известно, что большинству госпитализированных пациентов с COVID-19 назначение антибактериальных препаратов проводится эмпирически [11, 12]. Это обеспечивает формирование и распространение антибиотикорезистентных штаммов [18–21]. Необходимо помнить, что основой рациональной антибиотикотерапии является региональная или локальная особенность резистентности бактериальных агентов [16, 18]. Инфекции, вызванные устойчивыми штаммами, чаще требуют госпитализации и увеличивают продолжительность пребывания в стационаре, ухудшают прогноз для пациента по сравнению с заболеваниями, обусловленными чувствительными микроорганизмами, результатом чего является более высокий показатель летальности [22, 23]. Рациональная антибактериальная терапия невозможна без современных знаний этиологической структуры заболевания, антибиотико- и фагочувствительности возбудителя.

Целью исследования явилось изучение микробного консорциума НДП при ВБП, ассоциированных с SARS-CoV-2, оценка антибиотико- и фагорезистентности циркулирующих штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила мокрота, промывные воды бронхов, бронхоальвеолярный лаваж 486 пациентов, находящихся на стационарном лечении в 5 моногоспиталях Тюмени и Тюменской области с подтверждённым диагнозом

ВБП средней и тяжёлой степени и давших информированное добровольное согласие на проведение исследования. Из них у 282 человек подтверждено наличие SARS-CoV-2. Почти в 90% случаев пациенты получали кислородотерапию, около 8% больных были подключены к аппаратам искусственной вентиляции лёгких.

Отбор и транспортировка биологического материала для лабораторного исследования проводились в соответствии с требованиями законодательства РФ в отношении возбудителей инфекционных заболеваний человека I–II групп патогенности¹. Посев клинических проб осуществлялся на протяжении 6 мес (с апреля по октябрь 2020 г.). Штаммы выделяли общепринятыми методами в соответствии с Приказом № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»². Отобранные бактерии идентифицировали по прямому белковому профилированию с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с программным обеспечением «Maldi BioTyper 3.0». Уровень достоверности выше 2,0 свидетельствовал о точном определении вида микроорганизма. Для каждого исследованного штамма бактерий приводилась ссылка на National Center for Biotechnology Information.

Резистентность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллера–Хинтона («HiMedia»), результаты анализировали в соответствии с действующими нормативными документами³.

Чувствительность *Streptococcus* spp. (157 культур) оценивали к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, клиндамицину, цефотаксиму, левофлоксацину, азитромицину. Бактерии рода *Staphylococcus* (46 штаммов) исследовали на устойчивость к ингибиторзащищённому ампициллину, офлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, имипенему, меропенему, цефокситину, клиндамицину, азитромицину, амикацину. У штаммов бактерии рода *Enterococcus* (22 штаммов) определя-

ли антибиотикограмму с использованием дисков с ампициллином, амоксициллин/сульбактамом, амоксициллин/клавулановой кислотой, ципрофлоксацином, левофлоксацином, имипенемом, меропенемом, гентамицином, ванкомицином. Проводилась интерпретация зон задержки роста изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий (74 штаммов) и бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (95 культур микроорганизмов) под воздействием ампициллина, амоксициллин/клавулановой кислоты, амикацина, ципрофлоксацина, меропенема, имипенема, цефотаксима, цефепима, цефтазида, цефоперазон/сульбактама, ко-тримоксазола.

В соответствии с клиническими рекомендациями⁴ изучена чувствительность 30 штаммов *K. pneumoniae* к двум коммерческим бактериофагам (АО НПО «Микроген»): бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (П261, выпуск 1118) и секстафаг (П11, выпуск 0219).

На сухую поверхность среды Мюллера–Хинтона наносили культуру микроорганизма в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл и с помощью шпателя равномерно распределяли на поверхности питательной среды. Через несколько минут после подсыхания инокулята, не касаясь поверхности агара, капали исследуемые бактериофаги. Чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч.

Литическую активность фага оценивали по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»):

- «–» — отсутствие литической активности;
- «+» — низкая активность;
- «++» — образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерий;
- «+++» — зона лизиса с единичными колониями вторичного роста;
- «++++» — прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием программного обеспечения «Statistica v.22» («IBM SPSS»), предназначенного для научных работ. Если значения *p*-критерия были менее 0,05, а доверительные интервалы разности средних не содержали внутри себя 0, то гипотеза об их равенстве отвергалась и с достоверностью 95% можно было утверждать, что исследуемые группы различались по величине оцениваемого явления.

Результаты и обсуждение

У 282 (58%) пациентов с диагнозом ВБП с помощью ПЦР выявлен вирус SARS-CoV-2. Практически у десятой части пациентов, вне зависимости

¹ СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». М., 2020; МР 4.2.0114-16 «Методические рекомендации. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии». М., 2016; МУК 4.2.3115-13 «Методические указания. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний». М., 2014.

² Приказ Министерства здравоохранения СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации бактериологических (микробиологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

³ Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». М., 2017; МУК 4.2.1890–04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., 2004.

⁴ Федеральные клинические (методические) рекомендации «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противэпидемической практике». М., 2014.

от наличия SARS-CoV-2, условно-патогенные бактерии в биоматериале не были обнаружены (SARS-CoV-2 обнаружен — 10,6%, SARS-CoV-2 не обнаружен — 12,3%).

В ходе бактериологического исследования в биопробах пациентов с положительными тестами на РНК SARS-CoV-2 выделено и изучено 430 штаммов микроорганизма, с отрицательными результатами — 297 культур. Безусловно, при сборе мокроты происходит её контаминация бактериями носоглоточной слизи (верхних дыхательных путей), поэтому при статистической обработке результатов учитывался диагностически значимый для мокроты титр количества микроорганизмов. В структуре бактерий преобладали грамположительные кокки, в основном они представлены родом *Streptococcus* и грибами рода *Candida*. Подавляющее большинство культур микроорганизмов рода *Streptococcus* spp. относились к сапрофитной микрофлоре слизистой верхних дыхательных путей, из условно-патогенных стрептококков был изолирован *S. pneumoniae* только у 5 пациентов с лабораторно подтверждённым COVID-19. По результатам идентификации клинических штаммов грибов рода *Candida* особое место заняли *C. albicans* (80%), кроме того, были выделены *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*.

Сравнительная характеристика микробиоценоза мокроты, промывных вод бронхов и альвеолярного лаважа больных с ВБП в зависимости от лабораторного подтверждения SARS-CoV-2 представлена в **табл. 1**.

При оценке частоты встречаемости различных групп микроорганизмов было установлено, что шансы обнаружения грамположительных микро-

организмов были выше при наличии у пациентов в пробах РНК SARS-CoV-2 ($p < 0,001$). Шанс выявления неферментирующих грамотрицательных бактерий и бактерий семейства *Enterobacteriaceae* у данной категории обследованных оказался ниже, чем у пациентов с отрицательными результатами ПЦР-исследования на коронавирусную инфекцию ($p = 0,040$ и $p = 0,012$) соответственно. При сравнении частоты встречаемости других бактерий в зависимости от наличия SARS-CoV-2 статистически значимые различия отсутствовали.

В **табл. 2** показаны данные об основной структуре потенциальных возбудителей ВБП, выделенных из биоматериала пациентов. Лидирующее место из семейства *Enterobacteriaceae* занимают бактерии *K. pneumoniae*. Большая часть неферментирующих грамотрицательных бактерий представлена штаммами *Acinetobacter* spp.

Наибольшие уровни резистентности выявлены у штаммов *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. и коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. (96,9, 75,8 и 75,4% соответственно), изолированных от пациентов с наличием вируса SARS-CoV-2. При этом у больных без лабораторного подтверждения SARS-CoV-2 наибольшая устойчивость бактерий зафиксирована у *Acinetobacter* spp., коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. и *K. pneumoniae* (92,3, 74,2 и 70% соответственно; **табл. 3**).

При сравнении показателей устойчивости микрофлоры в зависимости от наличия у пациентов SARS-CoV-2 с помощью расчёта шансов установлена статистически подтверждённая разница по антибиотикорезистентности штаммов в группе неферментирующих грамотрицательных бактерий и

Таблица 1. Результаты сравнения частоты обнаружения микроорганизмов в биопробах пациентов в зависимости от выявления SARS-CoV-2

Table 1. Results of comparison of the frequency of detection of microorganisms in biological samples of patients depending on the detection of SARS-CoV-2

Бактерии Bacteria	SARS-CoV-2				p	% (95% ДИ) % (95% CI)
	обнаружен / detected (n = 430)		не обнаружен / not detected (n = 297)			
	абс. / abs	%	абс. / abs	%		
Грамположительные бактерии (<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.) Gram-positive bacteria (<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.)	156	36,3	69	23,2	<0,001*	1,88 (1,34–2,62)
Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> Bacteria of the family <i>Enterobacteriaceae</i>	47	10,9	48	16,2	0,040*	1,56 (1,01–2,42)
Неферментирующие грамотрицательные бактерии Non-fermenting gram-negative bacteria	38	8,8	44	14,8	0,012*	1,79 (1,12–1,66)
Грибы рода <i>Candida</i> <i>Candida</i> fungi	160	37,2	112	37,7	0,891	0,97 (0,72–1,32)
Прочие Others	29	6,7	24	8,1	0,496	0,82 (0,46–1,44)

Примечание. *Статистически значимые различия.

Note. *Statistically significant differences.

Таблица 2. Видовой состав микроорганизмов, обнаруженных в содержимом НДП пациентов с диагнозом ВБП
Table 2. Species composition of microorganisms found in the contents of the lower respiratory tract of patients diagnosed with community-acquired pneumonia

Виды бактерий Types of bacteria	Частота выявления SARS-CoV-2 / SARS-CoV-2 detection frequency			
	обнаружен / detected		не обнаружен / not detected	
	абс. / abs	%	абс. / abs	%
Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> Bacteria of the family <i>Enterobacteriaceae</i>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	42,55	30	62,50
<i>Escherichia coli</i>	7	14,89	7	14,58
<i>Enterobacter</i> spp.	12	25,53	6	12,50
<i>Proteus mirabilis</i>	3	6,38	2	4,17
Прочие (единичные) Other (single)	5	10,64	3	6,25
Грамотрицательные неферментирующие бактерии Non-fermenting gram-negative bacteria				
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	26,32	11	25,00
<i>Acinetobacter</i> spp.	16	42,11	28	63,64
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	13,16	4	9,09
Прочие (единичные) Other (single cases)	7	18,42	1	2,27
Грамположительные бактерии Gram-positive bacteria				
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	6,41	9	13,04
<i>Staphylococcus</i> spp., кроме <i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus</i> spp., except <i>S. aureus</i>	20	12,82	7	10,14
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	3,21	2	2,90
<i>Streptococcus</i> spp., кроме <i>S. pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> spp., except <i>S. pneumoniae</i>	107	68,59	43	62,32
<i>Enterococcus</i> spp.	14	8,97	8	11,59

бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также у представителей рода *Streptococcus* spp. и у изолятов *S. aureus*.

Статистический анализ выявил, что в группе пациентов с ВБП, ассоциированными с SARS-CoV-2, шансы встретить резистентные штаммы *Streptococcus* spp. в 1,5 раза выше, а с учётом 95% доверительного интервала величина этого показателя составила 1,1–2,1 раза.

У пациентов с отрицательным ПЦР-тестом на COVID-19 шансы обнаружить антибиотико-резистентные штаммы выше в группе неферментирующих грамотрицательных бактерий за счёт *Pseudomonas* spp., среди штаммов семейства *Enterobacteriaceae* — за счёт *K. pneumoniae*. Также зафиксирован более высокий уровень устойчивых штаммов *S. aureus* у данной категории пациентов.

Данные о резистентности грамположительных и грамотрицательных бактерий в зависимости от вида антимикробного препарата представлены в **табл. 4** и **табл. 5**.

Группа бактерий *Streptococcus* spp. представлена преимущественно следующими видами: *S. mitis*,

S. parasanguinis, *S. vestibularis*, *S. salivarius*, *S. oralis*, которые проявляли наибольший уровень устойчивости к антимикробным препаратам пенициллинового ряда. Все указанные бактерии признаны доминирующей флорой слизистых оболочек верхних дыхательных путей, обеспечивающей нормобиоценоз у здоровых людей. Штаммы *S. pneumoniae*, изолированные от пациентов с подтверждённым COVID-19, отличались резистентностью к азитромицину. Среди бактерий рода *Staphylococcus* обнаружены *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, чаще демонстрирующие резистентность к пенициллиновой группе и азитромицину. Выявлены 2 штамма *S. aureus*, которые чувствительны только к амикацину. Штаммы бактерий рода *Enterococcus* представлены преимущественно видом *E. faecium*, отличались множественной резистентностью, исключение составил ванкомицин.

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* показывают высокий уровень толерантности к пенициллинам, что связано с природной устойчивостью штаммов *K. pneumoniae*, а также к цефалоспорином III поколения, при этом цефалоспорины IV поколения демонстрировали максимальную чувствитель-

Таблица 3. Антибиотикорезистентность бактерий, изолированных из биоматериала пациентов с ВБП**Table 3.** Antibiotic resistance of bacteria isolated from the biosamples of patients with community-acquired pneumonia

Бактерии Bacteria	SARS-CoV-2				p	% (95% ДИ) % (95% CI)
	обнаружен / detected (n = 299)		не обнаружен / not detected (n = 242)			
	абс. / abs	%	абс. / abs	%		
Неферментирующие грамотрицательные бактерии Non-fermenting gram-negative bacteria	31	67,5	43	78,6	0,011*	1,8 (1,14–2,76)
<i>Acinetobacter</i> spp.	16	96,9	28	92,3	0,131	2,6 (1,39–9,37)
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	30,9	11	49,3	0,027*	2,2 (1,09–4,35)
Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> Bacteria of the family <i>Enterobacteriaceae</i>	47	31	48	48,4	<0,001*	2,1 (1,52–2,87)
<i>Escherichia coli</i>	7	25	7	32,7	0,377	1,5 (1,59–3,37)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	41,9	30	69,9	<0,001*	3,2 (2,04–5,1)
<i>Enterobacter</i> spp.	12	15,8	6	8,1	0,259	2,1 (1,78–8,05)
Грамположительные кокки: Gram-positive cocci:						
<i>Enterococcus</i> spp.	14	75,8	8	66,7	0,174	1,6 (1,22–3,01)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	16,7	9	29,0	0,036*	2,0 (1,04–4,02)
<i>Staphylococcus</i> spp., кроме <i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus</i> spp., except <i>S. aureus</i>	20	75,4	7	74,2	0,854	1,1 (1,78–2,01)
<i>Streptococcus</i> spp.	112	51,2	45	41,0	0,019*	1,5 (1,07–2,13)

Примечание. *Статистически значимые различия.

Note. *Statistically significant differences.

ность. Для лечения пневмоний, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями, оптимально применять цефтазидим и цефоперазон/сульбактам. Практически все штаммы *Serratia marcescens* были чувствительны к ко-тримоксазолу, что является особенностью данной культуры.

Проведено исследование чувствительности 30 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов с ВБП, ассоциированной с SARS-CoV-2, к двум коммерческим бактериофагам (бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный и сектафаг) методом Spot-test. Выявлен один клинический штамм *K. pneumoniae*, проявляющий чувствительность к вышеуказанным бактериофагам. Концентрацию фаговых частиц определяли методом агаровых слоёв по Грациа [24]. Титр бактериофагов составлял 10⁸ БОЕ/мл. Таким образом, решение вопроса о необходимости расширения банка бактериофагов к наиболее значимым возбудителям бактериальных инфекций требует дальнейших углублённых исследований.

Выводы

1. В структуре микробиоты НДП пациентов при ВБП средней и тяжёлой степени, ассоциированной с SARS-CoV-2, преобладала грамположительная кокковая флора, представленная в основном бактериями рода *Streptococcus*, достоверно отличающимися большей резистентностью к антибиотикам.

2. Микробиом отделяемого НДП пациентов с ВБП средней и тяжёлой степени при отсутствии подтверждения наличия SARS-CoV-2 характеризовался более частым обнаружением грамотрицательных бактерий: семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter* spp.).

3. Высокая антибиотикорезистентности от наличия коронавируса, регистрировалась преимущественно к пенициллиновой группе антимикробных препаратов.

4. Грамотрицательные изоляты семейства *Enterobacteriaceae* характеризуются резистентностью к пенициллиновой группе антимикробных препаратов и цефалоспорином III поколения; неферментирующие грамотрицательные бактерии — множественной лекарственной устойчивостью.

5. Исследованные штаммы *K. pneumoniae* показали высокую резистентность к коммерческим бактериофагам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang D., Xing Y., Song X., Qian Y. The impact of lung microbiota dysbiosis on inflammation. *Immunology*. 2020; 159(2): 156–66. <https://doi.org/10.1111/imm.13139>
2. Похиленко В.Д. Как микробиом легких борется с бактериальной и вирусной инфекцией. Чебоксары; 2020. <https://doi.org/10.21661/a-723>

Таблица 4. Антибиотикорезистентность грамположительных изолятов от пациентов с ВБП, %

Table 4. Antibiotic resistance of gram-positive bacteria isolates from patients diagnosed with community-acquired pneumonia, %

Антибиотики Antibiotics	<i>Streptococcus</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Enterococcus</i> spp.	
	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)
Ампициллин / Ampicillin	79,6	70,7	–	–	86,7	75
Ампициллин/сульбактам Ampicillin/sulbactam	–	–	75	63,6	–	–
Амоксициллин/клавулановая кислота Amoxicillin/clavulanic acid	79,6	70,7	75	63,6	85,7	71,4
Амоксициллин/сульбактам Amoxicillin/sulbactam	–	–	–	–	100	71,4
Офлоксацин / Ofloxacin	–	–	54,2	41,7		
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	–	–	57,7	41,7	85,7	75
Левифлоксацин Levofloxacin	17,4	14,5	54,2	41,7	83,3	75
Имипенем / Imipenem	–	–	55,6	46,2	100	100
Меропенем / Meropenem	–	–	46,7	46,2	100	100
Цефокситин / Cefoxitin	–	–	62,0	60,0	–	–
Цефотаксим / Cefotaxime	46,9	28,2	–	–	–	–
Клиндамицин / Clindamycin	16,1	13,3	46,7	46,7	–	–
Азитромицин / Azithromycin	15,3	9,6	70	62,5	–	–
Амикацин / Amikacin	–	–	6,7	18,8	–	–
Гентамицин / Gentamicin	–	–	–	–	60	75
Ванкомицин / Vancomycin	–	–	–	–	0	0

Таблица 5. Антибиотикорезистентность грамотрицательных изолятов от пациентов с ВБП, %

Table 5. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria isolates from patients diagnosed with community-acquired pneumonia, %

Антибиотики Antibiotics	Семейство <i>Enterobacteriaceae</i> Bacteria family <i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Неферментирующие грамотрицательные бактерии Non-fermenting gram-negative bacteria		<i>Acinetobacter</i> spp.	
	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)
Ампициллин / Ampicillin	80	77,8	–	–	–	–	–	–
Амоксициллин/клавулановая кислота Amoxicillin/clavulanic acid	69,2	80	76,5	84,6	–	–	–	–
Амикацин / Amikacin	20	36,5	31,6	56,7	69,2	74,4	93,8	85,7
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	35,5	54,9	57,9	79,3	73,1	82,1	100	96,4
Имипенем / Imipenem	15,2	40,4	25	66,7	73,1	79,5	100	92,9
Меропенем / Meropenem	17,4	38,5	30	66,7	76,9	79,5	100	92,9
Цефепим / Cefepim	12,5	0	–	–	73,1	82,1	100	92,9
Цефотаксим / Cefotaxime	48,4	72,5	50	80	–	–	–	–
Цефтазидим / Ceftazidime	–	–	–	–	33,3	54,5	–	–
Цефоперазон/сульбактам Cefoperazone/sulbactam	20	30	23,1	60	22,2	50,0	–	–
Ко-тримоксазол / Co-trimoxazole	–	–	–	–	0	25	–	–
БЛРС / ESBL	41,2	42,9	33,3	37,5	–	–	–	–


3. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Носков А.К., Ковалев Е.В., Чемисова О.С. и др. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (4): 99–105. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-4-99-105>
4. Бруснигина Н.Ф., Мазепа В.Н., Самохина Л.П., Черневская О.М., Орлова К.А., Сперанская Е.В. и др. Этиологическая структура внебольничной пневмонии. *Медицинский альманах*. 2009; (2): 118–21.
5. Фесенко О.В., Швайко С.Н. Пневмонии, вызванные *Klebsiella pneumoniae* (фридлендеровские пневмонии). *Практическая пульмонология*. 2019; (1): 22–31.
6. Молчанова О.В., Хамидулина А.И., Щенников Э.Л., Иванова О.А., Шмыленко В.А. Этиологическая структура внебольничной пневмонии у больных с факторами риска неблагоприятного течения заболевания. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2008; (12): 59–62.
7. Розанова С.М., Шилова В.П., Перевалова Е.Ю., Шевелева Л.В., Кругова К.В., Беикин Я.Б. и др. Микробиологическая диагностика вентилятор-ассоциированной пневмонии: практический опыт работы. *Уральский медицинский журнал*. 2008; 13(53): 64–7.
8. Стулова М.В., Кудряшева И.А., Полунина О.С., Черенова Л.П., Аршба Т.Е., Лисина О.А. и др. Сравнительный клинико-лабораторный анализ COVID-19 ассоциированной пневмонии с внебольничной пневмонией бактериальной этиологии. *Современные проблемы науки и образования*. 2020; (3): 134. <https://doi.org/10.17513/spno.29905>
9. Sharov K.S. SARS-CoV-2-related pneumonia cases in pneumonia picture in Russia in March–May 2020: Secondary bacterial pneumonia and viral co-infections. *J. Glob. Health*. 2020; 10(2): 020504. <https://doi.org/10.7189/jogh.10-020504>
10. Lucien M.A.B., Canarie M.F., Kilgore P.E., Jean-Denis G., Fénélon N., Pierre M., et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 104: 250–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.087>
11. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2020; 81(2): 266–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
12. Lai C.C., Wang C.Y., Hsueh P.R. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(4): 505–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.013>
13. Getahun H., Smith I., Trivedi K., Paulin S., Balkhy H.H. Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic. *Bull. World Health Organ.* 2020; 98(7): 442–A. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.268573>
14. Sharifipour E., Shams S., Esmkhani M., Khodadadi J., Fotouhi-Ardakani R., Koohpaei A., et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 646. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05374-z>
15. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223): 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
16. Vaillancourt M., Jorth P. The unrecognized threat of secondary bacterial infections with COVID-19. *mBio*. 2020; 11(4): e01806-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01806-20>
17. Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Вирусно-бактериальные коинфекции как глобальная проблема современной медицины. *Иммунология. Инфекционная патология*. 2018; 22(1): 29–42. <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2018-22-1-29-42>
18. Холодок Г.Н. Лекарственная резистентность клинических изолятов возбудителей пневмоний у детей Приамурья. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2009; (2): 38–40.
19. Cantón R., Gijón D., Ruiz-Garbayosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr. Opin. Crit. Care*. 2020; 26(5): 433–41. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>
20. Mahmoudi H. Bacterial co-infections and antibiotic resistance in patients with COVID-19. *GMS Hyg. Infect. Control*. 2020; 15: 35. <https://doi.org/10.3205/dgkh000370>
21. Ko K.S. Antibiotic-resistant clones in Gram-negative pathogens: presence of global clones in Korea. *J. Microbiol.* 2019; 57(3): 195–202. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8491-2>
22. Савенкова М.С. Макролиды: современные исследования и показания к назначению «нового» кларитромицина. *Детские инфекции*. 2012; 11(1): 37–43.
23. Цыганко Д.В., Бердникова Н.Г. Исследование микробиологических особенностей инфекций нижних дыхательных путей в стационаре. *Национальная ассоциация ученых*. 2015; (6-3): 36–9.
24. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В., Золотухин С.Н., Мاستиленко А.В., Киселева И.А. и др. *Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроцессинг)*. Ульяновск; 2019.

REFERENCES

1. Yang D., Xing Y., Song X., Qian Y. The impact of lung microbiota dysbiosis on inflammation. *Immunology*. 2020; 159(2): 156–66. <https://doi.org/10.1111/imm.13139>
2. Pokhilenko V.D. How the Lung Microbiome Fights Bacterial and Viral Infection [Kak mikrobiom legkikh boretsya s bakterial'noy i virusnoy infektsiyey]. Cheboksary; 2020. <https://doi.org/10.21661/a-723> (in Russian)
3. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Noskov A.K., Kovalev E.V., Chemisova O.S., et al. Features of etiology of community-acquired pneumonia associated with COVID-19. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (4): 99–105. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-4-99-105> (in Russian)
4. Brusnigina N.F., Mazepa V.N., Samokhina L.P., Chervenetskaya O.M., Orlova K.A., Speranskaya E.V., et al. Etiological structure of community-acquired pneumonia. *Meditsinskiy al'manakh*. 2009; (2): 118–21. (in Russian)
5. Fesenko O.V., Shvayko S.N. Pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* (Friedlander's pneumonia). *Prakticheskaya pul'monologiya*. 2019; (1): 22–31. (in Russian)
6. Molchanova O.V., Khamidulina A.I., Shchennikov E.L., Ivanova O.A., Shmylenko V.A. Etiological structure of nonhospital pneumonia for patients with risk factors with unfavourable disease process. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2008; (12): 59–62. (in Russian)
7. Rozanova S.M., Shilova V.P., Perevalova E.Yu., Sheveleva L.V., Kругова К.В., Beikin Ya.B., et al. Microbiological diagnostics of ventilator-associated pneumonia: practical experience. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 13(53): 64–7. (in Russian)
8. Stulova M.V., Kudryasheva I.A., Polunina O.S., Cherenova L.P., Arshba T.E., Lisina O.A., et al. Comparative clinical and laboratory analysis of COVID-19 associated pneumonia with community-acquired pneumonia, bacterial etiology. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2020; (3): 134. <https://doi.org/10.17513/spno.29905> (in Russian)
9. Sharov K.S. SARS-CoV-2-related pneumonia cases in pneumonia picture in Russia in March–May 2020: Secondary bacterial pneumonia and viral co-infections. *J. Glob. Health*. 2020; 10(2): 020504. <https://doi.org/10.7189/jogh.10-020504>

10. Lucien M.A.B., Canarie M.F., Kilgore P.E., Jean-Denis G., Fénélon N., Pierre M., et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 104: 250–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.087>
11. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2020; 81(2): 266–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
12. Lai C.C., Wang C.Y., Hsueh P.R. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(4): 505–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.013>
13. Getahun H., Smith I., Trivedi K., Paulin S., Balkhy H.H. Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic. *Bull. World Health Organ.* 2020; 98(7): 442–A. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.268573>
14. Sharifipour E., Shams S., Esmkhani M., Khodadadi J., Fotouhi-Ardakani R., Koohpaei A., et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 646. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05374-z>
15. Vaillancourt M., Jorth P. The unrecognized threat of secondary bacterial infections with COVID-19. *mBio.* 2020; 11(4): e01806-2. <https://doi.org/10.1128/mBio.01806-20>
16. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020; 395(10223): 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
17. Balmasova I.P., Malova E.S., Sepiashvili R.I. Viral and bacterial coinfection as a global problem of modern medicine. *Immunologiya. Infektsionnaya patologiya.* 2018; 22(1): 29–42. <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2018-22-1-29-42> (in Russian)
18. Kholodok G.N. Drug resistant clinical isolates agent of pneumonia in children Amur-river region. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka.* 2009; (2): 38–40. (in Russian)
19. Cantón R., Gijón D., Ruiz-Garbajosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2020; 26(5): 433–41. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>
20. Mahmoudi H. Bacterial co-infections and antibiotic resistance in patients with COVID-19. *GMS Hyg. Infect. Control.* 2020; 15: 35. <https://doi.org/10.3205/dgkh000370>
21. Ko K.S. Antibiotic-resistant clones in Gram-negative pathogens: presence of global clones in Korea. *J. Microbiol.* 2019; 57(3): 195–202. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8491-2>
22. Savenkova M.S. Macrolides: current research and indication for the appointment of a "new" clarithromycin. *Detskie infektsii.* 2012; 11(1): 37–43. (in Russian)
23. Tsyganko D.V., Berdnikova N.G. The study of the microbiological features of the lower respiratory tract infections in the hospital. *Natsional'naya assotsiatsiya uchenykh.* 2015; (6-3): 36–9. (in Russian)
24. Vasil'ev D.A., Feoktistova N.A., Aleshkin A.V., Zolotukhin S.N., Mastilenko A.V., Kiseleva I.A., et al. *Development of Biotechnological Parameters for the Creation of Bacteriophage Biological Products for Decontamination of Microflora that Causes Spoilage of Food Raw Materials of Animal Origin and Meat, Fish, Dairy Products (Bioprocessing) [Razrabotka biotekhnologicheskikh parametrov sozdaniya bakteriofagovykh biopreparatov dlya dekontaminatsii mikroflory, vyzyvayushchey porchu pishchevogo syr'ya zhivotnogo proiskhozhdeniya i myasnykh, rybnyykh, molochnykh produktov (bioprotsessing)].* Ulyanovsk; 2019. (in Russian)

Информация об авторах

Катаева Любовь Владимировна  — к.м.н., в.н.с., зав. бактериологической лабораторией ТНИИКИП, Тюмень, Россия, kataevalv@tniikip.rosпотребнадzor.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>

Вакарина Арина Александровна — м.н.с. бактериологической лаборатории ТНИИКИП, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3112-4722>

Степанова Татьяна Федоровна — д.м.н., проф., директор ТНИИКИП, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>

Степанова Ксения Борисовна — к.м.н., в.н.с., зав. клиническим отделением ТНИИКИП, Тюмень, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5420-0919>

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 04.05.2021;
принята к публикации 27.07.2021;
опубликована 25.10.2021

Information about the authors

Lyubov V. Kataeva  — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Bacteriological laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia, kataevalv@tniikip.rosпотребнадzor.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9966-8454>

Arina A. Vakarina — junior researcher, Bacteriological laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3112-4722>

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

Kseniya B. Stepanova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Clinical department, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5420-0919>

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 04.05.2021;
accepted for publication 27.07.2021;
published 25.10.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара и их молекулярно-генетический анализ

Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А.[✉], Крицкий А.А., Кутырев В.В.

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

Аннотация

Цель работы — выявление и молекулярно-генетическая характеристика чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара, выделенных на территории России.

Материалы и методы. В работе использовали 56 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных от больных и из внешней среды в России в 1970–2020 гг. Устойчивость к полимиксину В определяли согласно МУК 4.2.2218-07. Для изучения способности штаммов формировать биоплёнку на абиотической поверхности использовали фотометрический метод. Нуклеотидные последовательности генов устанавливали с применением программ «UGENE v.1.32» и «MEGA X». Филогенетический анализ и построение дерева производили с помощью программы «MEGA X», используя метод «максимальной бережливости».

Результаты и обсуждение. Выявлены 2 чувствительных к полимиксину В клинически генетически изменённых штамма *V. cholerae* O1 El Tor биовара M1509 и 3265/80, завезённых в Россию из Индии в 2012 и 2014 гг. соответственно. При изучении структуры 12 генов, обеспечивающих устойчивость штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара к полимиксину В, установлено, что указанные штаммы содержат аллель гена *carR^S*, что характерно для всех чувствительных к полимиксину В штаммов *V. cholerae*. Изучение филогении штаммов *V. cholerae* M1509 и 3265/80 на основе SNP-анализа показало, что они входят в один кластер с изолятами, содержащими аллель *carR^S* и выделенными в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.). При сравнительном изучении способности штаммов *V. cholerae* M1509 и 3256/8 к формированию биоплёнки установлено, что они не отличаются по данному свойству от других, взятых в анализ генетически изменённых штаммов *V. cholerae*.

Заключение. В Россию завозятся высоковирулентные штаммы возбудителя холеры с изменёнными диагностически значимыми признаками, что необходимо учитывать при идентификации штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, выделяемых от больных и из внешней среды при мониторинговых исследованиях.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* O1 El Tor биовара, чувствительность к полимиксину В, филогенетический анализ

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

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

Для цитирования: Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А., Крицкий А.А., Кутырев В.В. Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара и их молекулярно-генетический анализ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):538–547.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

Identification of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B and their molecular genetic analysis

Svetlana P. Zadnova, Yaroslav M. Krasnov, Nikita A. Plekhanov[✉],
Andrey A. Kritskiy, Vladimir V. Kuttyrev

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Abstract

The aim of the work was the identification and genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B among isolates imported to Russia.

Materials and methods. We used 56 toxigenic and non-toxigenic strains of *V. cholerae* isolated from patients and from the environmental samples on the territory of Russia in 1970-2020. Resistance to polymyxin B was determined according to MR4.2.218-07. The ability of strains to form a biofilm on the abiotic surface was assessed by a photometric method. Nucleotide sequences of genes were determined using UGENE 1.32 and MEGA X software. Phylogenetic analysis and tree construction were performed using "maximum parsimony" method in MEGA X software.

Results and discussion. Two genetically modified strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor, M1509 and 3265/80, which were imported to Russia from India in 2012 and 2014, respectively, were identified. The analysis of 12 genes responsible for the resistance of *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains to polymyxin B demonstrated that these strains contain the allele of the *carR^S* gene, which is typical for all strains of cholera vibrio sensitive to polymyxin B. Study of *V. cholerae* M1509 and 3265/80 phylogeny based on SNP analysis showed that they fall into the same cluster with isolates containing the *carR^S* allele isolated in India (2015) and Bangladesh (2018). *V. cholerae* M1509 and 3265/80 strains had the ability to form a biofilm similar to those observed in other genetically modified strains of cholera vibrio included into analysis.

Conclusion. Highly virulent strains of the cholera agent with altered diagnostically significant features are imported into Russia, which should be taken into account when identifying *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains isolated from patients and environmental samples during monitoring studies.

Keywords: *Vibrio cholerae* O1 El Tor biovar; sensitivity to polymyxin B, phylogenetic

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

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

For citation: Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Plekhanov N.A., Kritsky A.A., Kutryev V.V. Identification of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B and their molecular genetic analysis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):538–547.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

Введение

Возбудителями холеры, острой инфекционной болезни с диарейным синдромом, распространяющейся в виде эпидемий и пандемий, являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы (классического и El Tor биоваров) и O139 серогруппы. Штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара предположительно были причиной первых 6 опустошительных пандемий. В 1961 г. началась 7-я пандемия, обусловленная типичными токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor биовара [1]. Вибрионы O139 серогруппы, явившиеся производными El Tor вибрионов и вызвавшие ряд тяжёлых эпидемий в 1992–1994 гг., в настоящее время не имеют эпидемиологической значимости. Классические вибрионы, продуцируя повышенное количество холерного токсина, ответственное за развитие диареи, вызывают более тяжёлую форму холеры, в отличие от El Tor вибрионов, но последние лучше выживают во внешней среде. В 1990-х гг. было зафиксировано появление генетически изменённых штаммов (геновариантов) *V. cholerae* O1 El Tor биовара с повышенной вирулентностью, которые в результате горизонтального переноса приобрели гены классических вибрионов. Данные штаммы содержали в опероне *ctxAB*, кодирующем биосинтез холерного токсина, ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (аллель *ctxB1*). Дальнейшие эволюционные преобразования геновариантов привели к появлению штаммов с новой аллелью гена *ctxB* — *ctxB7*, а также изменённой структурой дру-

гих генов патогенности и пандемичности. Геноварианты очень быстро вытеснили типичные штаммы на эндемичной территории и вызвали ряд крупных эпидемий в разных странах мира [2, 3]. Начиная с 1993 г. все вспышки и единичные случаи холеры на территории России также были вызваны генетически изменёнными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor биовара. Молекулярно-генетические свойства завезённых в Россию геновариантов изучены достаточно подробно. Многие штаммы секвенированы и депонированы в базе данных NCBI GenBank [4–9].

Холерные вибрионы классического и El Tor биоваров, несмотря на принадлежность к одной O1 серогруппе, отличаются по фенотипическим свойствам, которые используются для дифференциации биоваров. При определении биовара исследуют чувствительность к холерным диагностическим фагам (классическому и El Tor), способность расти на средах с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В, агглютинировать куриные эритроциты, образовывать ацетилметилкарбинол в реакции Фогес–Проскауэра. Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара, в отличие от классических вибрионов, чувствительны к диагностическому холерному фагу El Tor, агглютинируют куриные эритроциты, устойчивы к полимиксину В (Po1B^R) и образуют ацетилметилкарбинол в реакции Фогес–Проскауэра [1]. При этом признак устойчивости El Tor вибрионов к полимиксину В долгое время оставался одним из стабильных диагностически значимых тестов. Однако в Индии в 2012 г. впервые за всю историю 7-й пандемии хо-

леры были выделены чувствительные к полимиксину В (PolB^S) штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара. Начиная с 2014 г. практически все циркулирующие на данной территории штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара были PolB^S [10, 11]. Чувствительные к полимиксину В штаммы *V. cholerae* не только быстро распространились в Индии, но и были занесены в другие страны Азии и в Африку. Так, крупнейшая эпидемия холеры в Йемене (более 1 млн заболевших) в 2016–2018 гг., охватившая все области страны, была вызвана PolB^S штаммами *V. cholerae* O1 El Tor. Данные штаммы также явились причиной вспышки холеры в Кении в 2015–2017 гг. [11–14].

Устойчивость штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара к полимиксину В обеспечивается участием продуктов 12 генов: *almGFE* (VC1577-VC1579), *vexB* (VC0164), *msbB/lpxN* (VC0212), *gspIFE* (VC2728, 2731, 2732), *VC0224*, *lpxL* (VC0213), *carRS/vprAB* (VC1320, VC1319) [15–19]. При этом важный механизм резистентности к данному антибиотику связан с уменьшением отрицательного заряда липополисахарида внешней мембраны в результате его модификации (аминоацелирование и глицилирование). Глицилирование липополисахарида (присоединение глицина или диглицина) происходит при участии продуктов генов *almEFG* оперона. В результате данного процесса катионный антибиотик полимиксин В теряет способность связываться с липополисахаридным слоем клеток штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара. В свою очередь транскрипция генов *almEFG* оперона положительно регулируется белками двухкомпонентной *carRS* (или *vprAB*) системы, включающей сенсорный белок CarS (VprA) и ДНК-связывающийся регуляторный белок CarR (VprB) [18, 19]. Необходимо отметить, что система *carRS* не только контролирует транскрипцию генов *almEFG* оперона, но и является негативным регулятором процесса формирования биоплёнки. Белок CarR репрессирует экспрессию генов *vps*, ответственных за продукцию важного компонента биопленки — экзополисахарида [20].

При проведении молекулярно-генетического исследования PolB^S штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара было установлено, что они, в отличие от штаммов классического биовара, имеют иной механизм появления чувствительности к полимиксину В. В штаммах *V. cholerae* O1 классического биовара изменена структура гена *almF*, в то же время отличительной особенностью PolB^S штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара является наличие единичной замены гуанина на аденин в позиции 265 в гене *carR* (аллель *carR^S*). PolB^S штаммы El Tor биовара, содержащие аллель *carR^S*, синтезируют белок CarR со сниженной транскрипционной активностью, что приводит к уменьшению экспрессии *almEFG* оперона и снижению процесса модификации липополисахарида клеточной стенки [10, 21].

Таким образом, в современный период 7-й пандемии холеры на эндемичной территории появились и распространяются высоковирулентные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара с изменённым диагностически значимым признаком — чувствительные к полимиксину В, что диктует необходимость детального изучения их патогенных и адаптивных свойств.

Учитывая нестабильную эпидемиологическую ситуацию по холере в мире и возможность завоза высоковирулентных штаммов возбудителя холеры в нашу страну, **цель** работы состояла в выявлении и молекулярно-генетической характеристике чувствительных к полимиксину В штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара, выделенных на территории России.

Материалы и методы

В работе было использовано 56 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, изолированных от людей или из открытых водоёмов на территории России, из которых 10 являются типичными токсигенными изолятами (1970–1990 гг.), 21 — токсигенными генетически изменёнными (1993–2014 гг.) и 25 — нетоксигенными (2012–2020 гг.) штаммами. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

Чувствительность штаммов к полимиксину В («Sigma») определяли в соответствии с Методическими указаниями МУК 4.2.2218-07 (2007), культивируя их при 37°C на пластинках питательного LB агар (рН 7,2) с добавлением антибиотика из расчёта 50 мкг на 1 мл среды. В качестве отрицательного контроля использовали штамм *V. cholerae* 569В O1 серогруппы классического биовара (Индия, 1950).

Способность штаммов к формированию биоплёнки определяли, выращивая культуру в полистироловых плашках (объём 200 мкл) в LB бульоне («Difco») при 37°C в течение 18–24 ч. Образовавшуюся биоплёнку фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида и окрашивали 0,4% раствором кристаллвиолета. Окрашенную биоплёнку растворяли в диметилсульфоксиде и измеряли оптическую плотность раствора на приборе «Stat Fax 2100» («Awareness Technology Inc.») при длине волны 570 нм [22]. Эксперимент проводили трехкратно, результаты представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего арифметического.

Для анализа нуклеотидных последовательностей генов, участвующих в обеспечении устойчивости штаммов *V. cholerae* к полимиксину В, использовали последовательности полных геномов штаммов *V. cholerae*, секвенированные ранее и депонированные в международной базе данных NCBI GenBank [4]. Структура гена *carR* была изучена нами у 71 штамма с применением программ «UGENE v.1.32» (Россия) и «MEGA X» (США). Сравнение

проводили относительно генома референс-штамма *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара N16961 (AE003852.1). Для филогенетического анализа и построения дерева применяли программу «MEGA X», используя метод «максимальной бережливости». В работу были взяты полные геномы 1246 штаммов *V. cholerae*, представленные на момент проведения филогенетического анализа в NCBI GenBank. Для оценки достоверности филогенетической реконструкции проводили Bootstrap анализ с числом повторных выборов, равным 100.

Результаты

Изучение устойчивости штаммов *V. cholerae* биовара El Tor к полимиксину В

На первом этапе работы было проведено изучение устойчивости взятых в исследование токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара к полимиксину В. В результате установлено, что все типичные штаммы были устойчивы к данному антибиотику и хорошо росли на среде LB с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В (рис. 1, таблица).

Полученные нами сведения об устойчивости типичных штаммов El Tor биовара к полимиксину В были ожидаемыми и соответствовали данным литературы [1].

В отличие от типичных штаммов, при анализе геновариантов были выявлены две группы. Изоляты первой, наиболее многочисленной группы (90,5%), сохраняли данный диагностически значимый признак и были PolB^R. Штаммы второй группы, включающей всего два изолята — *V. cholerae* M1509 и 3265/80, были чувствительны к полимиксину В (таблица, рис. 1). Эти штаммы были завезены в Россию



Рис. 1. Рост штаммов *V. cholerae* на агаре LB без (а) и с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В (б).

1 — *V. cholerae* O1 классического биовара 569В (отрицательный контроль); 2 — типичный штамм *V. cholerae* O1 El Tor биовара М818 (положительный контроль); 3–7 — геноварианты *V. cholerae* O1 El Tor биовара М1509, М1293, L3226, М1430, 3265/80 соответственно.

Fig. 1. Growth of *V. cholerae* strains on LB agar without (a) and with addition of 50 µg/ml of polymyxin B (b).

1 — *V. cholerae* O1 classical biovar 569B (negative control); 2 — typical M818 strain of *V. cholerae* O1, biovar El Tor (positive control); 3–7 — genovariants of *V. cholerae* O1, biovar El Tor, M1509, M1293, L3226, M1430, 3265/80, respectively.

из Индии в 2012 и 2014 гг. соответственно. Стоит обратить внимание, что штаммы *V. cholerae* L3226 и L4150, также завезённые из Индии, но в 2010 г., являются PolB^R и относятся к первой группе (таблица). Полученные нами данные согласуются со сведениями литературы о появлении PolB^S изолятов на территории Индии начиная с 2012 г. [10].

Учитывая, что каждый год на территории нашей страны при мониторинговых исследованиях открытых водоёмов выделяется значительное количество нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, мы расширили список исследуемых штаммов, взяв в работу изоляты, выделенные в 2012–2020 гг. (таблица). При проведении анализа указанных штаммов установлено, что все они были PolB^R.

Таким образом, при изучении устойчивости взятых в анализ штаммов *V. cholerae* к полимиксину В обнаружены два PolB^S изолята, которые завезены в Россию в последние годы и относятся к клиническим токсигенным генетически изменённым штаммам *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

Молекулярно-генетический и филогенетический анализ PolB^S штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара

Учитывая данные литературы о влиянии на устойчивость к полимиксину В продуктов 12 генов, мы изучили нуклеотидную последовательность данных генов у взятых в анализ токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, полные геномы которых представлены в базе данных GenBank (таблица). В результате установлено, что, действительно, только у PolB^S штаммов *V. cholerae* M1509 и 3265/80 присутствует несинонимичная SNP (замена G на A в позиции 265) в гене *carR* (аллель *carR^S*). В результате замены гуанина на аденин в нуклеотидной последовательности гена *carR* происходят смена кодона GAC на AAC и замещение отрицательно заряженной аспарагиновой кислоты в позиции 89 на нейтрально заряженный аспарагин в белке CarR (рис. 2). Именно данная замена приводит к конформационным изменениям белковой молекулы, снижению транскрипционной активности белка CarR и появлению чувствительности к полимиксину В [21].

Ранее установлено, что штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80 имеют структуру генома, характерную для современных высоковирулентных штаммов возбудителя холеры [5, 9, 23]. При филогенетическом анализе они вошли в один кластер со штаммами, выделенными в Непале в 2010 г. (VC-25, VC-26, VC-14) и на острове Гаити (HC-19A1^{AGUJ01}, HC-80A1^{AGVB01}, HC-22A1^{AGUL01}, HC-23A1^{AGUM01}, HC-28A1^{AGUN01}, HC-43A1^{AGUQ01}, HC-06A1^{AGUI01}, 2010EI-1786^{SANM10863496}) [9, 24]. Мы изучили нуклеотидную последовательность гена *carR* у всех штаммов данной группы и определили, что они имеют аллель *carR^R* (данные не показаны).

Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара, использованные в работе, их чувствительность к полимиксину В и способность к формированию биоплёнки

Strains of *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor, used in this work, their sensitivity to polymyxin B and ability to form biofilm

Штамм Strain	Год, место и источник выделения The year, site and source of isolation	Рост на среде LB + 50 мкг/мл PoIB Growth on LB + 50 medium, µg/ml PoIB	Формирование био- плёнки (оптическая плотность при 570 нм) Biofilm formation (optical density at 570 nm)
Типичные токсигенные штаммы / Typical toxigenic strains			
M818 ^{LAHM01}	1970, Балаково, человек / 1970, Balakovo, patient	+	H/o / N/d
M887, M893 ^{SSAA01} , M1062 ^{SSAB01}	1970, Астрахань, человек / 1970, Astrakhan, patient	+	H/o / N/d
M736, M738	1970, Пермь, человек / 1970, Perm, patient	+	H/o / N/d
M1011 ^{SSAC01} , M1013	1972, Уфа, человек / 1972, Ufa, patient	+	H/o / N/d
M1261	1990, Пермь, человек / 1990, Permian, patient	+	H/o / N/d
C402	1990, Ставрополь, человек / 1990, Stavropol, patient	+	H/o / N/d
Генетически изменённые токсигенные штаммы / Genetically altered toxigenic strains			
M1270 ^{VXCC01}	1993, Набережные Челны, человек 1993, Naberezhnye Chelny, patient	+	7,5 ± 0,12
M1264	1993, Краснодар, человек / 1993, Krasnodar, patient	+	4,4 ± 0,18
M1298	1993, Краснодар, человек / 1993, Krasnodar, patient	+	7,0 ± 0,24
M1275 ^{LRAF01}	1993, Каспийск, человек / 1993, Kaspiysk, patient	+	8,2 ± 0,09
M1297	1993, Каспийск, человек / 1993, Kaspiysk, patient	+	5,3 ± 0,1
M1268	1994, Магнитогорск, человек / 1994, Magnitogorsk, patient	+	4,8 ± 0,15
M1293 ^{JFFW01}	1994, Дагестан, человек / 1994, Dagestan, patient	+	8,3 ± 0,16
R17644 ^{JRTW01}	1997, Ачинск, человек / 1997, Achinsk, patient	+	4,5 ± 0,1
M1326	1998, Дагестан, человек / 1998, Dagestan, patient	+	6,1 ± 0,14
M1327	1998, Дагестан, человек / 1998, Dagestan, patient	+	H/o / N/d
M1344 ^{NEDY01}	2001, Казань человек / 2001, Kazan, patient	+	7,3 ± 0,22
M1345	2001, Казань, человек / 2001, Kazan, patient	+	H/o / N/d
M1429 ^{LAEM01}	2004, Белорецк, человек / 2004, Beloretsk, patient	+	5,5 ± 0,18
M1430	2005, Тверь, человек / 2005, Tver, patient	+	7,1 ± 0,1
P-18899 ^{LAKM01}	2006, Мурманск, человек / 2006, Murmansk, patient	+	6,1 ± 0,2
L3226 ^{JDVX01}	2010, Москва, человек / 2010, Moscow, patient	+	9,3 ± 0,09
L4150	2010, Москва человек / 2010, Moscow, patient	+	6,8 ± 0,16
301 ^{AJFN01}	2011, Таганрог, в.с. / 2011, Taganrog, e.s.	+	H/o / N/d
M1509 ^{NEDZ01}	2012, Москва, человек / 2012, Moscow, patient	–	9,8 ± 0,1
3265/80 ^{JRQL01}	2014, Москва, человек / 2014, Moscow, patient	–	7,2 ± 0,13
81 ^{JRQM01}	2014, Ростов, в.с. / 2014, Rostov, e.s.	+	H/o / N/d
Нетоксигенные штаммы / Non-toxigenic strains			
M1517 ^{VTZZ01} , 29 ^{VUAB01} , M1516 ^{VTZY01} , M1526 ^{VUAA01} , M1518 ^{LQZR01} , 111 ^{VTLQ01}	2012, Элиста, в.с. / 2012, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
132 ^{VUAC01} , 85 ^{VUAF01} , M1524 ^{LQZS01}	2013, Элиста, в.с. / 2013, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
8 ^{PYCF01} , M1522 ^{LQCA01}	2014, Элиста, в.с. / 2014, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
2613 ^{PYCA01} , 2687 ^{PYCB01} , 2688 ^{PYCC01} , 124 ^{PYCD01}	2015, Элиста, в.с. / 2015, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
433 ^{NEDW01}	2015, Сочи, в.с. / 2015, Sochi, e.s.	+	H/o / N/d
2843 ^{PYCG01}	2016, Элиста, в.с. / 2016, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
3178 ^{PYCH01} , 124 ^{PYCD01}	2017, Элиста, в.с. / 2017, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
120 ^{VTLL01} , 136 ^{VTLK01} , 2439 ^{VTLL01} , 3017 ^{VTLM01}	2018, Элиста, в.с. / 2018, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
50863, 10349	2020, Татарстан, в.с. / 2020, Tatarstan, e.s.	+	H/o / N/d

Примечание. В надстрочном индексе штаммов указан сокращённый код доступа в GenBank; в.с. — внешняя среда;

«+» — штамм даёт рост на среде с полимиксином В, «–» — рост отсутствует; н/о — не определяли.

Note. In the superscript index of strains, the abbreviated GenBank accession number is indicated; e.s. — environmental sample; «+» — the strain grows on the medium with polymyxin B, «–» — no growth; n/d — was not determined.

89

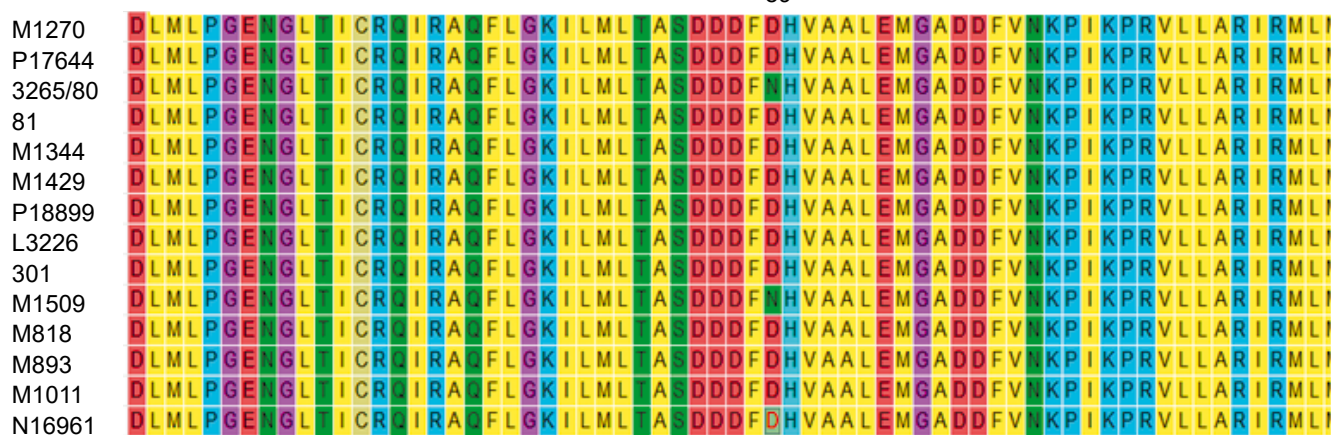


Рис. 2. Фрагмент аминокислотной последовательности белка CarR штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

Цифрами 89 сверху отмечена варибельная позиция (замена аспарагиновой кислоты на аспарагин).
PolB^R штаммы: геноварианты — M1270, P17644, 81, M1344, M1429, P18899, L3226, 301; типичные — M818, M893, M1011.
PolB^S штаммы: геноварианты — 3265/80, M1509. N16961 — референс-штамм *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

Fig. 2. Fragment of the amino acid sequence of the CarR protein of *V. cholerae* O1 strains, biovar El Tor.

The variable position (substitution of aspartic acid to asparagine) is indicated by the number 89 at the top.
PolB^R strains: genovariants — M1270, P17644, 81, M1344, M1429, P18899, L3226, 301; typical — M818, M893, M1011.
PolB^S strains: genovariants — 3265/80, M1509. N16961 — reference strain of *V. cholerae* O1, biovar El Tor.

Учитывая, что в настоящее время в GenBank депонированы штаммы *V. cholerae* El Tor биовара, изолированные на эндемичной территории в последние годы, в том числе PolB^S изоляты [21], нами также был проведён сравнительный филогенетический SNPs анализ и построено филогенетическое дерево (рис. 3).

В результате показано, что наиболее близкими к штаммам *V. cholerae* M1509 и 3256/80 были изоляты, выделенные в Бангладеш (провинция Дакка) в 2018 г., и штамм *V. cholerae* IDH 08148^{SISQ01}, изолированный в Индии (Калькутта) в 2015 г. При анализе нуклеотидной последовательности гена *carR* у данных штаммов было установлено, что все они содержат аллель *carR^S*.

Необходимо отметить, что клинические штаммы, выделенные в Бангладеш (провинция Дакка) в 2018 г., а также ранее (2015, 2016 гг.), образовывали ещё один кластер (рис. 3). Изучение последовательности гена *carR* штаммов этого кластера показало наличие аллеля *carR^R*. Отличия от группы *carR^S* штаммов составили 78–110 SNPs.

Устойчивый к полимиксину В штамм *V. cholerae* L3226 (Москва, 2010) вошёл в одну группу со штаммами, выделенными на Гаити в 2010–2012 гг., что соответствует ранее полученным данным [9]. При анализе нуклеотидной последовательности гена *carR* штаммов данной группы выявлено, как и ожидалось, что они имеют аллель *carR^R*.

Таким образом, штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80 филогенетически родственны штаммам *V. cholerae* El Tor биовара, выделенным в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.) и имеющим аллель *carR^S*.

Способность к формированию биоплёнки у PolB^S штаммов *V. cholerae*

V. cholerae может существовать в двух разных экологических нишах (вода открытых водоёмов и человек). Одной из важных стратегий, обеспечивающих адаптацию патогена при смене среды обитания, является способность к формированию биоплёнки. Биоплёнка защищает возбудителя холеры от действия стрессовых факторов и повышает его выживаемость как в воде открытых водоёмов, так и в кишечнике человека [25]. Учитывая важную роль биоплёнки в жизненном цикле патогена и отсутствие сведений о способности PolB^S штаммов *V. cholerae* образовывать биоплёнку, нами была изучена данная способность у взятых в анализ штаммов *V. cholerae*. Кроме того, было высказано предположение, что изменение функциональной активности белка CarR у PolB^S штаммов могло снизить его негативное влияние на процесс формирования биоплёнки. В результате установлено, что все геноварианты формировали хорошо выраженную биоплёнку. При этом PolB^S штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/8 не отличались по биоплёнкообразованию от других взятых в анализ генетически изменённых штаммов *V. cholerae* (таблица). Вероятно, присутствие аллеля *carR^S* не оказывает влияния на процесс формирования биоплёнки. Однако для окончательного решения данного вопроса необходимо проведение исследований на большем количестве PolB^S штаммов *V. cholerae*.

Обсуждение

Эволюционные преобразования генома геновариантов *V. cholerae* El Tor биовара продолжают. Появляются мутации в генах вирулентности, панде-

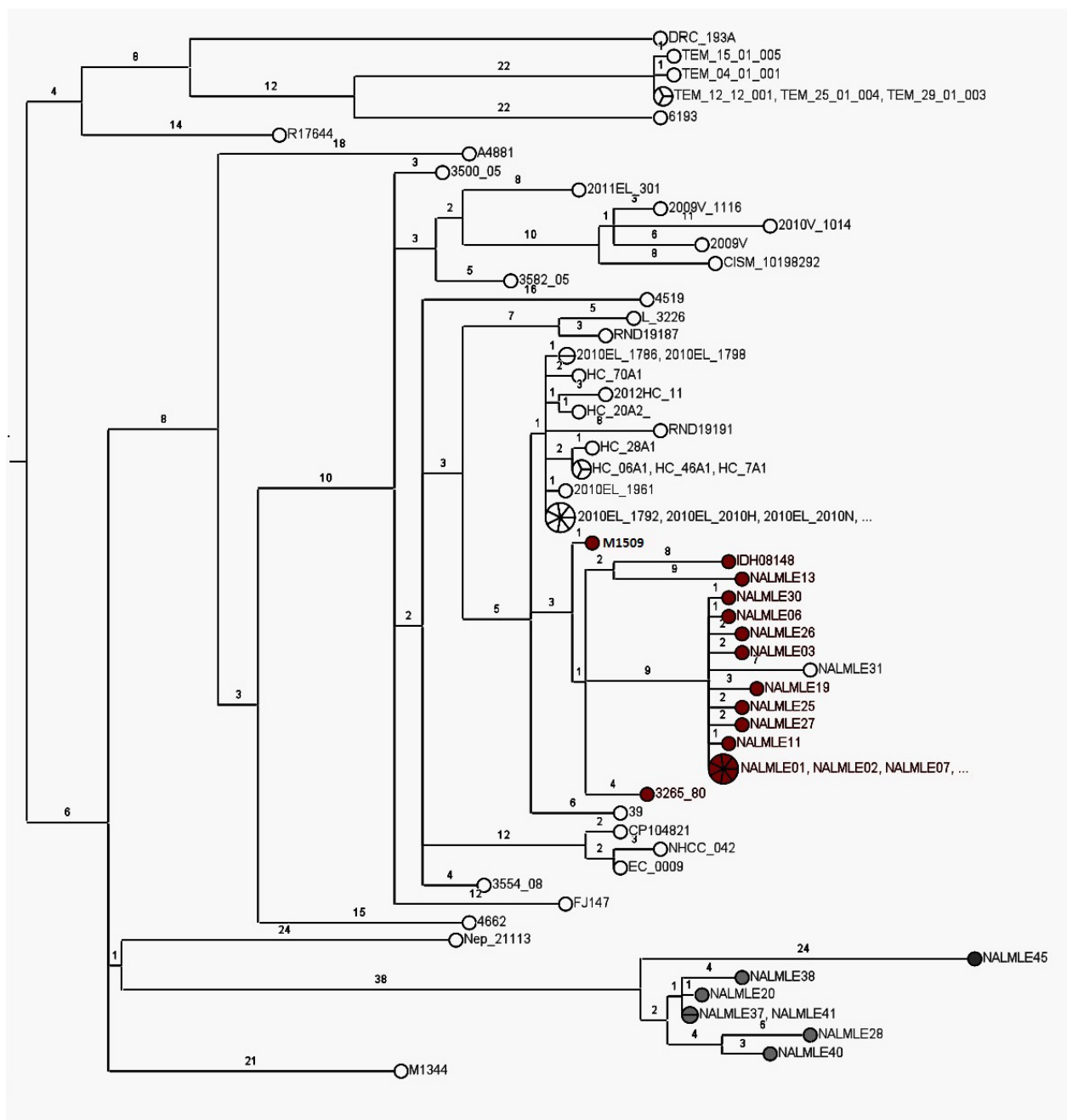


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе SNP-анализа полногеномных последовательностей токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биоара.

Чувствительные к полимиксину В *carR^S* штаммы *V. cholerae* M1509, 3265/80 и родственные им изоляты, выделенные в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.), отмечены темно-бордовыми точками. *CarR^R* штаммы, изолированные в Бангладеш в 2015 и 2016–2018 гг., указаны серыми точками. Остальные проанализированные токсигенные *carR^R* PoIB^R штаммы *V. cholerae*, завезённые в Россию в разные годы, относятся к разным филогенетическим группам (не отмечены).

Fig. 3. Phylogenetic tree based on SNPs analysis of genome-wide sequences of toxigenic strains of *V. cholerae* O1, biovar El Tor.

Susceptible to polymyxin B *carR^S* *V. cholerae* strains M1509, 3265 and related isolates from India (2015) and Bangladesh (2018) are marked with maroon dots. *CarR^R* strains isolates from Bangladesh in 2015 and 2016–2018 are indicated with gray dots. The remaining *carR^R* PoIB^R toxigenic strains of *V. cholerae* introduced into the Russian Federation in different years belong to different phylogenetic groups (not marked).

мичности, адаптации, жизнеобеспечения, антибиотикорезистентности [4, 5, 11, 23, 26]. Происходят изменения и в генах, ответственных за проявление диагностически значимых признаков, варибель-

ность которых уже показана многими исследователями. Так, среди 54 изученных клинических штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных в Индии в 1975–2015 гг., у 22% изолятов отсутство-

вала способность к агглютинации куриных эритроцитов, а у 24% — гемолитическая активность [14]. Показано, что у геновариантов изменена (снижена или отсутствует) способность к образованию ацетилметилкарбинола в реакции Фогес–Проскауэра. Одна из причин данного явления — изменение структуры гена *alsD* (делеция нуклеотида Т в позиции 315), что приводит к сдвигу рамки считывания, образованию преждевременного стоп-кодона и биосинтезу дефектного фермента ацетолактат декарбоксилазы [27, 28]. Появление устойчивых к диагностическому холерному фагу El Tor нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара способствовало активизации работ по поиску новых рас диагностических фагов [29]. Изменился и такой стабильный диагностический признак, как устойчивость к полимиксину В. Генетический механизм появления PolB^S штаммов *V. cholerae* El Tor биовара связан с изменением структуры гена *carR* и появлением аллеля *carR^S* [10, 21]. Вполне возможно, что в связи с вариабельностью диагностически значимых признаков у современных штаммов возбудителя холеры постановка фенотипических тестов определения биовара становится излишней, и ведущая роль принадлежит выявлению биоварспецифических аллелей генов генетическими методами.

Штаммы *V. cholerae*, чувствительные к полимиксину В, заносятся и в Россию. Выявлено, что штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80, завезённые из Индии в 2012 и 2014 гг. соответственно, являются PolB^S и имеют аллель *carR^S* (замена G на A в позиции 265), что характерно для всех чувствительных к полимиксину В штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, выделяемых в последние годы [10, 11]. Возможно, указанная SNP может стать ещё одной генетической меткой современных штаммов возбудителя холеры и использоваться при создании генодиагностических препаратов.

При филогенетическом SNPs анализе установлено, что штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80 родственны *carR^S* штаммам, выделенным в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.). Из-за отсутствия в литературе сведений об их чувствительности к полимиксину В можно лишь высказать предположение, что данные штаммы также являются PolB^S.

Чувствительные к полимиксину В высоковирулентные штаммы *V. cholerae* El Tor биовара, видимо, имеют более высокий адаптационный потенциал, т.к. не только вытеснили PolB^R изоляты *V. cholerae* El Tor биовара на территории Индии, но и явились причиной эпидемий и вспышек холеры в других странах Юго-Восточной Азии, а также на Африканском континенте [10, 11, 13, 21]. При этом повышение их адаптационных способностей, возможно, не связано со способностью формировать биоплёнку, а обусловлено изменением каких-то других свойств, исследование которых будет целью дальнейшей работы.

Таким образом, в Россию завозятся высоковирулентные штаммы возбудителя холеры с изменёнными диагностически значимыми свойствами, что необходимо учитывать при идентификации клинических и выделенных при мониторинговых исследованиях внешней среды штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
2. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
3. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
4. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109>
5. Smirnova N.I., Krasnov Ya.M., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Alkhova Z.V., Kutyrev V.V. Whole-genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Ukraine (2011) and Russia (2014). *Genome Announc.* 2017; 5(8): e01640-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01640-16>
6. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* eltor при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 88(5): 12–8.
7. Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ изменённых вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; (1): 57–61. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(111\)-57-61](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-57-61)
8. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабеныхев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2012; (5): 31–5.
9. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
10. Samanta P., Ghosh P., Chowdhury G., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Sensitivity to polymyxin B in El Tor *Vibrio cholerae* O1 strain, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(11): 2100–2. <https://doi.org/10.3201/eid2111.150762>
11. Samanta P., Saha R.N., Chowdhury G., Naha A., Sarkar S., Dutta S., et al. Dissemination of newly emerged polymyxin B sensitive *Vibrio cholerae* O1 containing Haitian-like genetic traits in different parts of India. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(9): 1326–33. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000783>
12. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
13. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between

- 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
14. Kanampalliwari A., Singh D.V. Virulence pattern and genomic diversity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated from clinical and environmental sources in India. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01838>
 15. Bina X.R., Provenzano D., Nguyen N., Bina J.E. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 2008; 76(8): 3595–605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01620-07>
 16. Matson J.S., Yoo H.J., Hakansson K., DiRita V.J. Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J. Bacteriol.* 2010; 192(8): 2044–52. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-10>
 17. Hankins J.V., Madsen J.A., Giles D.K., Childers B.M., Klose K.E., Brodbelt J.S., et al. Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Mol. Microbiol.* 2011; 81(5): 1313–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07765.x>
 18. Herrera C.M., Crofts A.A., Henderson J.C., Pingali S.C., Davies B.W., Trent M.S. The *Vibrio cholerae* Vpra-Vprb two-component system controls virulence through endotoxin modification. *MBIO.* 2014; 5(6): e02283-14. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02283-14>
 19. Bilecen K., Fong J.C.N., Cheng A., Jones C.J., Zamorano-Sánchez D., Yildiz F.H. Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect. Immun.* 2015; 83(3): 1199–209. <https://doi.org/10.1128/IAI.02700-14>
 20. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8): 2015–29. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x>
 21. Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., Shaw S., Ghosh P., Dutta S. et al. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020; 88(5): e00080-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
 22. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(1): 435–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.435-445.2001>
 23. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.X., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; (3): 17–26. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26>
 24. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. и др. Ситуация по холере в мире в 2018 году, прогноз на 2019 год. Научное обеспечение совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. Выпуск № 32.* Ростов-на-Дону; 2019: 12–21.
 25. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45(1): 275–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.45.1.275-283.1983>
 26. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI00189-16>
 27. Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Адамов А.К., Девдариани З.Л., Кутырев В.В. Сравнительный анализ метаболизма глюкозы в штаммах *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017; 35(2): 64–9. <https://doi.org/10.3103/S0891416817020112>
 28. Lee D., Kim E.J., Baek Y., Lee J., Yoon Y., Nair G.B., et al. Alterations in glucose metabolism in *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor biotype strains. *Nature.* 2020; 10(1): 308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57093-4>
 29. Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(12): 849–52. <https://doi.org/10.1882/0869-2084-2016-61-12-849-852>

REFERENCES

1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
2. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
3. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
4. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109> (in Russian)
5. Smirnova N.I., Krasnov Ya.M., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Alkhova Z.V., Kutyrev V.V. Whole-Genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Ukraine (2011) and Russia (2014). *Genome Announc.* 2017; 5(8): e01640-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01640-16>
6. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S., et al. Detection of "hybrid" *Vibrio cholerae* El Tor strains during epidemic complications in Siberia and the Far East. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 88(5): 12–8. (in Russian)
7. Zadnova S.P., Shashkova A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Phenotypic and genetic analysis of altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2012; (1): 57–61. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(11\)-57-61](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(11)-57-61) (in Russian)
8. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Babenyshev B.V., Kulichenko A.N. The evolution of the pathogen and the clinical and epidemiological features of the recent cholera (El Tor). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2012; (5): 31–5. (in Russian)
9. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kругликов V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
10. Samanta P., Ghosh P., Chowdhury G., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Sensitivity to polymyxin B in El Tor *Vibrio cholerae* O1 strain, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(11): 2100–2. <https://doi.org/10.3201/eid2111.150762>
11. Samanta P., Saha R.N., Chowdhury G., Naha A., Sarkar S., Dutta S., et al. Dissemination of newly emerged polymyxin B sensitive *Vibrio cholerae* O1 containing Haitian-like genetic traits in different parts of India. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(9): 1326–33. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000783>
12. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
13. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates

- responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
14. Kanampalliar A., Singh D.V. Virulence pattern and genomic diversity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated from clinical and environmental sources in India. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01838>
15. Bina X.R., Provenzano D., Nguyen N., Bina J.E. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 2008; 76(8): 3595–605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01620-07>
16. Matson J.S., Yoo H.J., Hakansson K., DiRita V.J. Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J. Bacteriol.* 2010; 192(8): 2044–52. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-10>
17. Hankins J.V., Madsen J.A., Giles D.K., Childers B.M., Klose K.E., Brodbelt J.S., et al. Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Mol. Microbiol.* 2011; 81(5): 1313–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07765.x>
18. Herrera C.M., Crofts A.A., Henderson J.C., Pingali S.C., Davies B.W., Trent M.S. The *Vibrio cholerae* Vpra-Vprb two-component system controls virulence through endotoxin modification. *MBIO.* 2014; 5(6): e02283-14. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02283-14>
19. Bilecen K., Fong J.C.N., Cheng A., Jones C.J., Zamorano-Sánchez D., Yildiz F.H. Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect. Immun.* 2015; 83(3): 1199–209. <https://doi.org/10.1128/IAI.02700-14>
20. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8): 2015–29. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x>
21. Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., Shaw S., Ghosh P., Dutta S. et al. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020; 88(5): e00080-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
22. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(1): 435–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.435-445.2001>
23. Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.X., Ramamurthy T. Endemic cholera in India and imported cholera in Russia: What is common? *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2020; (3): 17–26. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26> (in Russian)
24. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Chemisova O.S., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S. The situation of cholera in the world in 2018, forecast for 2019. Scientific support for improving epidemiological surveillance of cholera in the Russian Federation. In: *Cholera and Vibrio Pathogens for Humans: Collection of Articles by the Problem Commission (48.04) of the Coordinating Scientific Council for the Sanitary and Epidemiological Protection of the Russian Federation. Issue No. 32 [Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony: Sbornik statey po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii. Vypusk № 32].* Rostov-na-Donu; 2019: 12–21. (in Russian)
25. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45(1): 275–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.45.1.275-283.1983>
26. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI00189-16>
27. Zadnova S.P., Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Adamov A.K., Devdariani Z.L., Kuttyrev V.V. Comparative analysis of glucose metabolism in strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2017; 35(2): 64–9. <https://doi.org/10.3103/S0891416817020112> (in Russian)
28. Lee D., Kim E.J., Baek Y., Lee J., Yoon Y., Nair G.B., et al. Alterations in glucose metabolism in *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor biotype strains. *Nature.* 2020; 10(1): 308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57093-4>
29. Gaevskaya N.E., Makedonova L.D. The application of bacteriophages in laboratory diagnostic of cholera. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(12): 849–52. <https://doi.org/10.1882/0869-2084-2016-61-12-849-852> (in Russian)

Информация об авторах

Заднова Светлана Петровна — д.б.н., в.н.с. лаб. патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Краснов Ярослав Михайлович — к.х.н., зав. лаб. геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Плеханов Никита Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

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

Кутырев Владимир Викторович — д.м.н., проф., академик РАН, директор РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

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

Статья поступила в редакцию 22.04.2021;
принята к публикации 15.07.2021;
опубликована 30.10.2021

Information about the authors

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

Yaroslav M. Krasnov — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

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

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

Vladimir V. Kuttyrev — D. Sci. (Med), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

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.

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-180>

Оценка мутагенности, генотоксичности и хронической токсичности имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты в тест-системах *in vitro* и *in vivo*

Джайн Е.А.^{1✉}, Плеймс Д.², Глобенко А.А.¹¹АО «Валента Фарм», Москва, Россия;²«Myelo Therapeutics GmbH», Берлин, Германия

Аннотация

Введение. Имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты (ИПК) обладает доказанными на различных экспериментальных моделях противовирусными свойствами. Однако данные о токсикологических свойствах ИПК ограничены.

Цель. Оценить мутагенные и генотоксические свойства на моделях *in vitro* и *in vivo*, а также токсичность ИПК при хроническом пероральном введении крысам и собакам.

Материалы и методы. Мутагенные и генотоксические свойства ИПК оценивали в тесте Эймса, в тесте хромосомных aberrаций на лимфоцитах человека, в микроядерном тесте у крыс. Хроническую токсичность ИПК изучали на крысах линии Спрег-Дулли и собаках породы бигль обоих полов, которым ИПК вводили перорально в дозах 30–300 мг/кг/сут в течение 26 и 39 нед соответственно.

Результаты. В тесте Эймса внесение ИПК вплоть до максимальной дозы (5000 мкг на чашку) не приводило к увеличению числа ревертантных колоний. В концентрации до 5000 мкг/мл ИПК не вызывал хромосомных aberrаций в лейкоцитах человека. В дозах ≤ 2000 мг/кг ИПК не увеличивал количество микроядер в костном мозге крыс. В хронических экспериментах животные хорошо переносили введение ИПК: доза без наблюдаемого эффекта (NOEL) для крыс и собак составляла 300 мг/кг/сут.

Заключение. ИПК не проявлял мутагенных и генотоксических свойств в стандартных тестах *in vitro* и *in vivo*. При хроническом пероральном введении крысам и собакам NOEL ИПК, равная 300 мг/кг/сут, обеспечивала системную экспозицию, превышающую таковую у человека в 8–10 и в 41–65 раз соответственно. Полученные результаты позволяют считать профиль безопасности ИПК при длительном применении у человека обоснованно благоприятным.

Ключевые слова: *тест Эймса, хромосомные aberrации, микроядерный тест, имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты, Ингавирин*

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). Протоколы исследований (№ 30442/14, 30444/14, 30443/14 и 34058/19, 34059/19) одобрены Биоэтической комиссией АО «Валента Фарм».

Благодарность. Авторы выражают благодарность ООО «Статэндокс» (Россия) за помощь в подготовке публикации.

Источник финансирования. Работа финансировалась фармацевтической компанией АО «Валента Фарм» (Россия) и «Myelo Therapeutics GmbH» (Германия).

Конфликт интересов. Сотрудники «Myelo Therapeutics GmbH» (Германия) отвечали за организацию и проведение исследований, научное консультирование и рецензирование публикации. Сотрудники АО «Валента Фарм» (Россия) участвовали в анализе данных и подготовке публикации. Работа финансировалась фармацевтической компанией АО «Валента Фарм» (Россия) и «Myelo Therapeutics GmbH» (Германия).

Для цитирования: Джайн Е.А., Плеймс Д., Глобенко А.А. Оценка мутагенности, генотоксичности и хронической токсичности имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты в тест-системах *in vitro* и *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):548–557.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-180>

Evaluation of mutagenicity, genotoxicity and chronic toxicity of antiviral drug imidazolyl ethanamide pentandioic acid in *in vitro* and *in vivo* test systems

Ekaterina A. Jain¹✉, Dirk Pleimes², Aleksander A. Globenko¹

¹JSC Valenta Pharm Pharmaceutical Company, Moscow, Russia;

²Myelo Therapeutics GmbH, Berlin, Germany

Abstract

Introduction. The antiviral properties of imidazolyl ethanamide pentandioic acid (IPA), the active compound of the drug product, has been proven in various experimental models. However, the literature data on the toxicological properties of IPA are limited.

Purpose. To evaluate mutagenic and genotoxic properties in *in vitro* and *in vivo* models, as well as to study the toxicity of IPA following chronic oral administration to rats and dogs.

Materials and methods. Mutagenic and genotoxic properties of IPA were assessed using the Ames test, the test of chromosomal aberrations in human lymphocytes, and the micronucleus test in rats. The chronic toxicity of IPA was studied in Sprague Dawley rats and beagle dogs of both sexes, to which IPA was administered orally at doses of 30–300 mg/kg/day for 26 and 39 weeks, respectively.

Results and discussion. In the Ames test, the addition of IPA up to the maximum dose (5000 mcg/plate) did not result in the increase in the number of revertant colonies. At a concentration of up to 5000 mcg/ml, IPA did not cause chromosomal aberrations in human leukocytes. At doses ≤ 2000 mg/kg, IPA did not increase the amount of micronuclei in the bone marrow of rats. In chronic experiments, animals tolerated the administration of IPA well: the dose without an observed effect (NOEL) for rats and dogs was 300 mg/kg/day.

Conclusion. IPA did not show mutagenic and genotoxic properties in standard *in vitro* and *in vivo* tests. With chronic oral administration to rats and dogs, NOEL IPA equal to 300 mg/kg/day provided a systemic exposure that was 8–10 and 41–65 times higher than that in humans, respectively. The results obtained allow us to consider the safety profile of the prolonged use in humans as favorable.

Keywords: Ames test, chromosomal aberrations, micronucleus test, imidazolyl ethanamide pentandioic acid, Ingavirin

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 protocols (Nos. 30442/14, 30444/14, 30443/14 и 34058/19, 34059/19) was approved by the Bioethics Committee of the JSC Valenta Pharm Pharmaceutical Company.

Acknowledgement. The authors are grateful to «Statendox LLC» (Russia) for assistance in preparing the publication.

Funding source. The work was funded by the pharmaceutical company «Valenta Pharm JSC» (Russia) and «Myelo Therapeutics GmbH» (Germany).

Conflict of interest. Employees of «Myelo Therapeutics GmbH» (Germany) were responsible for the organization and conduct of research, scientific advice and review of the publication. Employees of «Valenta Pharm LLC» (Russia) participated in the data analysis and preparation of the publication. The work was funded by the pharmaceutical company «Valenta Pharm JSC» (Russia) and «Myelo Therapeutics GmbH» (Germany).

For citation: Jain E.A., Pleimes D., Globenko A.A. Evaluation of mutagenicity, genotoxicity and chronic toxicity of antiviral drug imidazolyl ethanamide pentandioic acid in *in vitro* and *in vivo* test systems. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):548–557.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-180>

Введение

Имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты (ИПК) является противовирусным лекарственным средством с широким спектром действия, предназначенным для лечения и профилактики гриппа А и В и других острых респираторных вирусных инфекций, включая риновирус, аденовирус, коронавирусы, парагрипп, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, энтеровирус. Механизм действия ИПК реализуется на уровне инфицированных клеток

за счёт активации факторов врождённого иммунитета, подавляемых вирусными белками [1, 2].

В ряде исследований, выполненных в 2009–2012 гг., эффективность использования ИПК подтверждена *in vitro* и *in vivo* в отношении вирусов гриппа А(H1N1/09)v, А(H5N1), А(H3N2), в том числе пандемических штаммов А/California/04/2009 (H1N1)v, А/California/07/2009 (H1N1)v, А/Moscow/225/2009 (H1N1)v, А/Moscow/226/2009 (H1N1)v, А/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и А/Aichi/2/68

(H3N2), а также аденовируса и метапневмовируса [1, 3–12]. Кроме того, по данным ряда исследований, проведённых в 2005–2019 гг., ИПК обладает противовоспалительным и иммуномодулирующим действием [13, 14], оказывает гемопротекторный эффект [15–21]. В то же время данные об отдельных токсикологических параметрах ИПК представлены недостаточно широко, что обуславливает необходимость их освещения по результатам доклинических исследований эффектов ИПК в широком диапазоне доз, проведённых в 2014–2019 гг.

Целью настоящей работы стала оценка мутагенных и генотоксических свойств ИПК с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*, а также изучение токсичности ИПК при хроническом пероральном введении, позволяющем оценить потенциальные дозозависимые риски применения препарата у человека в течение 3 мес и более.

Материалы и методы

Все эксперименты *in vitro* и *in vivo* были выполнены в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики и руководствами Организации экономического сотрудничества и развития. Работы выполнены в «LPT Laboratory of Pharmacology and Toxicology GmbH & Co.» (Гамбург, Германия) при научном консультировании «Myelo Therapeutics GmbH» (Берлин, Германия) с учётом актуальных законодательных требований, касающихся биоэтических норм проведения доклинических исследований, в частности Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

Во всех экспериментах использовали активную фармацевтическую субстанцию (АФС) ИПК.

Наличие мутагенных свойств у ИПК в диапазоне доз 100–5000 мкг на чашку изучали в тесте бактериальных мутаций с использованием ауксотрофных по гистидину штаммов *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 и TA1537 (тест Эймса; OECD Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test) с метаболической активацией (фракция S9 печени крыс) или без неё. Диапазон доз ИПК подбирали, базируясь на результатах предварительных тестов цитотоксичности, проведённых на штамме *S. typhimurium* TA100: количество колоний в чашках, в которые добавляли физиологический раствор, не отличалось от такового в чашках, в которые добавляли ИПК в дозах 1–5000 мкг на чашку включительно.

Способность ИПК вызывать хромосомные aberrации *in vitro* оценивали в культуре периферических лейкоцитов человека (OECD Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test) после инкубации с ИПК в диапазоне концентраций 625–5000 мкг/мл с метаболической активацией

(фракция S9 печени крыс) или без неё. В тестах *in vitro* все инкубации проводили в трипликатах. Диапазон концентраций для данного теста также подбирали, исходя из результатов предварительных экспериментов, в ходе которых лейкоциты культивировали в средах, содержащих ИПК в концентрациях 10–5000 мкг/мл включительно, в течение 4 ч в условиях метаболической активации или в течение 24 ч без неё. Во всех случаях присутствие ИПК в среде не оказывало негативного влияния на митотическую активность лейкоцитов и не оказывало цитотоксического действия.

Генетическую токсичность *in vivo* (OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test) определяли в эксперименте на 70 крысах линии Спрег-Дули (CrI:CD(SD); питомник «Charles River Laboratories», Германия). ИПК вводили однократно внутривентрикулярно в дозе 200, 600 или 2000 мг/кг; животные из группы отрицательного контроля получали носитель (0,5% водный раствор гидроксипропилметилцеллюлозы). В качестве положительного контроля использовали крыс, которым однократно вводили циклофосфамид в дозе 27 мг/кг. Животных подвергали эвтаназии в CO₂-камере через 24 или 48 ч после введения исследуемых соединений для оценки частоты выявления микроядер в полихромных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга.

Хроническую токсичность ИПК в 3 дозах изучали на крысах линии Спрег-Дули (CrI:CD(SD); питомник «Charles River Laboratories», Германия) и собаках породы бигль обоих полов (питомник «Marshall BioResources», США). Согласно действующей инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата, суточная доза ИПК для взрослого человека составляет 90 мг/кг, что соответствует дозе 9,3 мг/кг/сут для крыс и 2,7 мг/кг/сут для собак (при использовании коэффициентов пересчёта, равных 6,2 и 1,8 соответственно, и допущения, что масса тела человека составляет 60 кг) [22]. В качестве минимальной и максимальной доз ИПК для токсикологических исследований выбрали дозы 30 и 300 мг/кг/сут, которые у крыс должны были превышать максимально рекомендуемую дозу для человека в 3 и 30 раз, а у собак — в 15 и 150 раз соответственно. Средняя доза, рассчитанная как среднее геометрическое максимальной и минимальной доз, составила 100 мг/кг/сут для животных обоих видов.

Крысам (масса тела самцов 262,9–313,2 г, масса тела самок 192,3–250,8 г) АФС ИПК (в 0,5% водном растворе гидроксипропилметилцеллюлозы) вводили ежедневно внутривентрикулярно в течение 182 дней; животные из контрольной группы получали носитель. По 20 самок и 20 самцов крыс из каждой группы подвергали эвтаназии в CO₂-камере на следующий день после окончания введения; ещё по 5 особей каждого пола из групп носителя, средней и

высокой дозы ИПК умерщвляли через 4 нед наблюдения. Дополнительно по 9 особей каждого пола в группах ИПК и по 3 особи каждого пола в группе носителя использовали для определения токсикокинетических показателей, необходимых для оценки взаимосвязи между системной экспозицией лекарственного средства и возможными признаками интоксикации.

Собакам (по 4 самца и 4 самки на группу; масса 5,5–9,3 кг) вводили желатиновые капсулы, заполненные АФС ИПК, 1 раз в сутки в течение 39 нед; животным из контрольной группы вводили плацебо (пустые капсулы). По 3 животных каждого пола из каждой группы использовали для определения токсикокинетических параметров ИПК. Дополнительно по 2 животных каждого пола из группы плацебо и группы максимальной дозы использовали на этапе последующего наблюдения, длившемся 4 нед после отмены исследуемого лекарственного средства.

В ходе исследований проводили ежедневное клиническое наблюдение и еженедельный подробный осмотр животных, оценивали поведение и смертность. Динамику массы тела, потребления корма и воды регистрировали еженедельно.

Офтальмологический осмотр проводили при помощи офтальмоскопа «Heine» на 183-й и 211-й дни эксперимента у крыс и на 85–87, 268–270 и 301–302-й дни эксперимента у собак.

У крыс до введения ИПК, на 91-й и 183-й дни дозирования, а также по окончании периода последующего наблюдения (на 211-й день эксперимента), у собак до введения ИПК, на 91-й и 273-й дни дозирования, а также в конце периода последующего наблюдения (на 301-й день эксперимента) оценивали:

1) гематологические показатели:

- концентрацию гемоглобина;
- количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов;
- относительное количество ретикулоцитов;
- значения гематокрита;
- лейкоцитарную формулу (нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы);
- средний объём эритроцита (MCV);
- среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH);
- среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC) (с использованием анализатора ADVIA™ 120, «Siemens Diagnostics GmbH»);
- тромбопластиновое время;
- активированное частичное тромбопластиновое время (с использованием анализатора «Amx Destiny Plus™», «Tcoag Deutschland GmbH»);

2) параметры биохимического анализа крови — уровень альбумина, глобулина, альбумин-гло-

булинового коэффициента, билирубина, общего белка, аланинаминотрансферазы, аспартатамино-трансферазы, креатинина и мочевины (с использованием биохимического анализатора «Konelab 30i», «Thermo Fisher Scientific»).

Образцы крови для лабораторных анализов у крыс были взяты из венозного сплетения ретроульбарного пространства, у собак — из головной подкожной вены передней конечности (*vena cephalica*) или из большой подкожной вены задней конечности (*vena saphena magna*).

У крыс до введения ИПК, на 90/91-й, 182/183-й дни дозирования, а также в конце периода последующего наблюдения (на 210/211-й день эксперимента), у собак до введения ИПК, на 85-й, 267-й дни дозирования, а также в конце периода последующего наблюдения (на 296-й день эксперимента) брали анализ мочи и определяли уровень белка, глюкозы, билирубина, уробилиногена, кетоновых тел, гемоглобина, нитритов, оценивали pH, удельный вес («Combur 9® Test», «Roche Diagnostics GmbH»), содержание эпителиальных клеток, лейкоцитов, эритроцитов, микроорганизмов, кристаллов и других включений в осадке мочи методом световой микроскопии.

Патологоанатомическое исследование было проведено на 183-й, 274-й дни дозирования и в конце периода наблюдения — на 211-й и 303-й дни эксперимента у крыс и собак соответственно. После эвтаназии животных обескровливали путём вскрытия сонной артерии и выполняли макроскопическое обследование органов — исследовали головной мозг, состояние органов грудной и брюшной полостей, регистрировали любые патологические изменения внешнего вида и размеров.

Гистопатологическому исследованию подвергали головной мозг (конечный мозг, мозжечок и ствол мозга у животных обоих видов; гиппокамп и паравентрикулярные ядра — только у собак) и паравентрикулярные ядра — только у собак), гипофиз, глаз (вместе с оптическим нервом и гардеровой железой), язык (включая основание языка), слёзные железы, слюнные железы (нижнечелюстная, подъязычная, околоушная), тимус, щитовидные и паращитовидные железы, лимфатические узлы (шейный и брыжеечный), молочные железы, аорту (брюшную и грудную), сердце (левый и правый желудочек, перегородка), трахею (включая гортань), лёгкие (с главными бронхами и бронхиолами), пищевод, желудок, тонкую кишку (двенадцатиперстная кишка, тощая кишка, подвздошная кишка у животных обоих видов; пейеровы бляшки — только у крыс), толстую кишку (включая прямую кишку), слепую кишку, селезёнку, поджелудочную железу, желчный пузырь (у собак), печень, надпочечники, почки и мочеточники, мочевой пузырь, предстательную железу, семенные пузырьки, тестикулы, придатки яичка, яичники, матку, мышцы задней

конечности, седалищный нерв, тканевые скопления (включая регионарные лимфатические узлы), кожу (левый бок), спинной мозг (3 среза), костный мозг (у крыс — плечевая кость, у собак — бедренная кость и отдельно 7 ребро), грудину с костным мозгом, кости (у крыс — плечевую, локтевую и лучевую кости, у собак — бедренную кость с суставом). Перед подготовкой срезов регистрировали массу вышеперечисленных органов. Дополнительно у собак оценивали влияние ИПК на сердечно-сосудистую систему. Электрокардиограмму (ЭКГ) регистрировали в отведениях I, II, III, aVR, aVL и aVF (электрокардиограф «Cardiovit AT-1», «Schiller»). Определяли следующие параметры: частота сердечных сокращений, интервалы *QRS*, *QT* и *PQ*, сегмент *P*.

Периферическое систолическое и диастолическое артериальное давление (АД) измеряли на выбритом участке хвоста у животного, находящегося в сознании, используя тонометр «Vet HDO Monitor» («S+V medvet GmbH»).

Определение АД и параметров ЭКГ проводили на 1, 91, 273-й дни дозирования и на 296-й день у животных из групп отсроченного наблюдения.

В рамках токсикокинетических исследований концентрацию ИПК в плазме крови животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с нижним пределом количественного определения 5 мкг/мл. Образцы крови у крыс отбирали на 1, 87 и 182-й дни дозирования, у собак — на 1, 91, 273, 275 и 277-й дни дозирования.

При планировании токсикокинетических исследований статистические гипотезы не выдвигались, поэтому их проверка не проводилась, а для предоставления результатов использовали методы описательной статистики. Для статистического анализа полученных результатов в экспериментах для межгрупповых сравнений непрерывных количественных признаков применяли критерий Манна-Уитни (при распределении, отличающемся от нормального) или *t*-критерий Стьюдента с поправкой Даннета для множественных сравнений (при нормальном распределении признака); для оценки статистической значимости различий распределения качественных признаков использовали точный тест Фишера или критерий χ^2 .

Результаты

В тесте Эймса внесение ИПК вплоть до максимальной дозы, составлявшей 5000 мкг на чашку, не приводило к увеличению числа ревертантных колоний (т.е. колоний *S. typhimurium*, которые в результате мутации восстанавливали способность синтезировать гистидин при его низком содержании в питательной среде). В концентрации до 5000 мкг/мл ИПК не вызывал хромосомных aberrаций в лейкоцитах человека при инкубации в течение 4 или 24 ч.

В условиях метаболической активации мутагенных и генотоксических эффектов также не наблюдали. В эксперименте на крысах однократное введение ИПК в дозах ≤ 2000 мг/кг не вызывало увеличения количества микроядер в ПХЭ костного мозга: у животных, получивших ИПК в наибольшей дозе — 2000 мг/кг, через 24 и 48 ч после введения среднее количество микроядер составляло 0,4 и 0,5 на 1000 ПХЭ соответственно, а у крыс из групп отрицательного контроля — 0,6 и 0,5 на 1000 ПХЭ соответственно. Таким образом, в стандартных тест-системах *in vitro* и *in vivo* ИПК не проявлял мутагенных и генотоксических свойств.

Крысы и собаки хорошо переносили длительное введение ИПК в течение 26 и 39 нед соответственно: за период наблюдения гибели животных не зарегистрировали. У крыс, получивших ИПК, не выявили отличий от животных из контрольной группы в поведении, внешнем виде, а также характере испражнений. Не было установлено влияния ИПК на динамику массы тела (**рисунок**), потребление корма и воды, диурез. При гистопатологическом исследовании не наблюдали системных морфологических нарушений, которые могли бы быть связаны с введением ИПК.

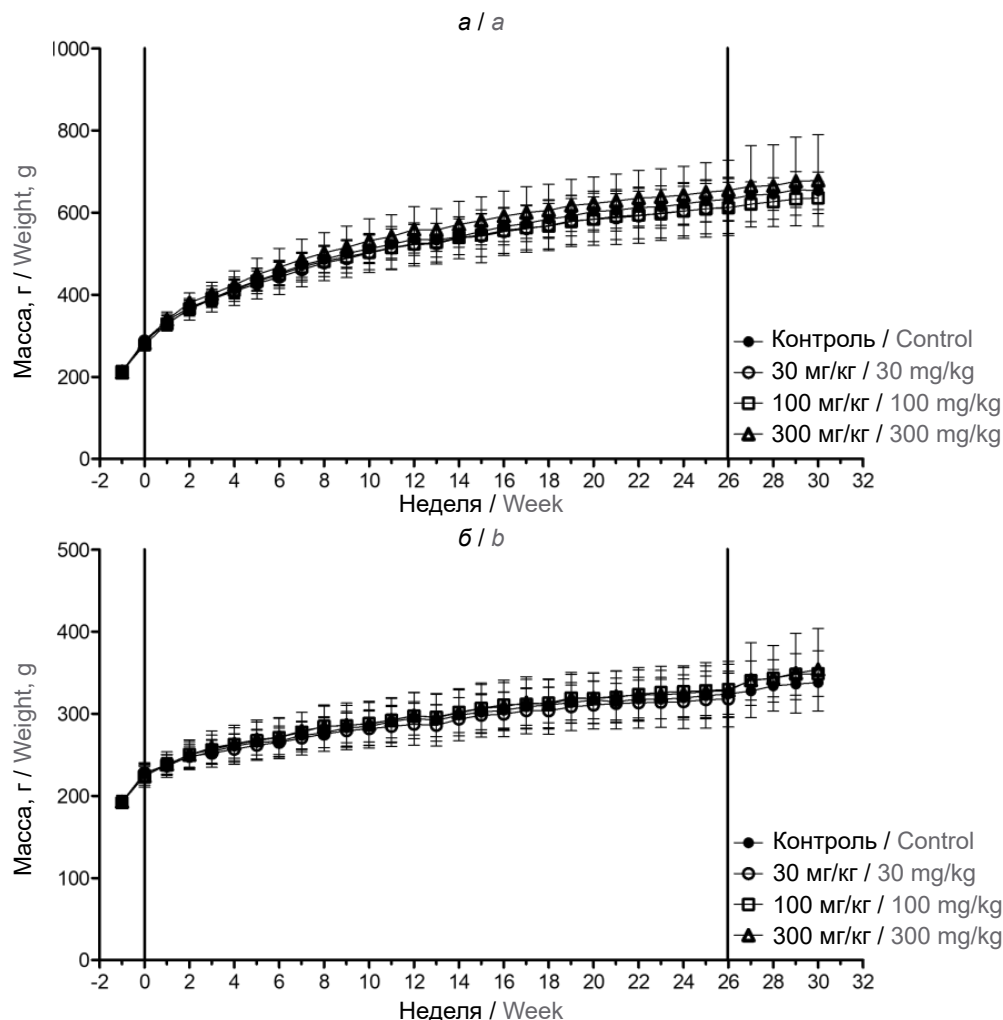
Изменений показателей гемограммы, в том числе параметров лейкоцитарной формулы (**табл. 1**), MCV, MCH, MCHC, тромбопластинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени, биохимического анализа крови, вызванных введением ИПК, у животных не выявили.

У собак, получивших ИПК, не выявили отличий от животных из контрольной группы в поведении, внешнем виде, массе тела, потреблении корма и воды, параметрах ЭКГ и АД. Слуховые и зрительные нарушения у животных, получивших ИПК, отсутствовали. При гистопатологическом исследовании не наблюдали системных морфологических нарушений, которые могли бы быть связаны с введением ИПК. Влияния ИПК на гематологические показатели, биохимические параметры крови у собак не выявили (**табл. 2**).

Интегральная оценка влияния ИПК на выделительную функцию почек по объёму и характеру диуреза, динамике содержания креатинина и мочевины в крови, а также микроскопического и биохимического анализа мочи не выявила изменений у крыс и собак в ходе эксперимента.

Проведённые эксперименты позволили установить, что для ИПК доза без наблюдаемого эффекта (NOEL) для животных обоих видов составляла 300 мг/кг/сут (максимальная использованная доза).

Полученные токсикокинетические данные свидетельствуют о том, что системная экспозиция ИПК, достигнутая в токсикологических исследованиях при введении крысам и собакам в течение 26 и 39 нед соответственно, существенно превы-



Динамика массы тела самцов (а) и самок (б) крыс.

Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения; вертикальными линиями отмечены границы периода дозирования.

Body weight dynamics in male (a) and female (b) rats.

The data shown as the mean and standard deviation; vertical lines indicate dosing period.

шала возможную у человека при применении в разрешённых терапевтических дозах¹. У крыс и собак, которым ИПК вводили в дозе 300 мг/кг/сут, $AUC_{0-\infty}$ составляла 22610,72–28036,64 и 111227,4–175862,0 нг×ч/мл соответственно, что было в 8–10 и в 41–65 раз соответственно выше средней AUC у здоровых добровольцев, однократно принимавших ИПК в дозе 180 мг, которая, согласно результатам клинического исследования, составляла $2715,27 \pm 587,31$ нг×ч/мл [23].

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ИПК в широком диапазоне доз не прояв-

ляет цитотоксических свойств в отношении *S. typhimurium* (в дозах до 5000 мкг на чашку) и лимфоцитов человека (в концентрациях до 5000 мкг/мл), не обладает мутагенными и генотоксическими свойствами *in vitro* и *in vivo*. Крысы и собаки хорошо переносили многократное введение ИПК в диапазоне доз 30–300 мг/кг/сут в течение 26 и 39 нед соответственно без каких-либо признаков дозозависимого токсического действия, что, согласно актуальным регуляторным руководствам, позволяет применять ИПК у человека в течение 3 мес и более².

¹ Согласно инструкциям по медицинскому применению терапевтические дозы препарата составляют 30, 60 и 90 мг, возможен прием препарата в дозе до 180 мг в течение 3 сут.

² Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

Таблица 1. Показатели лейкоцитарной формулы у крыс ($\times 10^3/\mu\text{л}$)
Table 1. Indicators of the leukocyte formula in rats ($\times 10^3/\mu\text{l}$)

День Day	Доза Dose	Лейкоциты White blood cells		Нейтрофилы Neutrophils		Лимфоциты Lymphocytes		Моноциты Monocytes		Эозинофилы Eosinophils		ЛУС LUC		Базофилы Basophils	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
91 (n = 10)	0	11,020	5,940	1,844	0,823	8,689	4,750	0,263	0,187	0,147	0,129	0,062	0,044	0,015	0,005
	30	10,567	6,982	1,630	1,022	8,413	5,581	0,251	0,182	0,188	0,145	0,073	0,048	0,013	0,007
	100	10,390	7,001	1,500	1,167	8,379	5,398	0,247	0,203	0,174	0,187	0,079	0,041	0,011	0,010
	300	10,617	8,028	1,710	1,241	8,328	6,279	0,293	0,249	0,195	0,186	0,082	0,065	0,012	0,009
183 (n = 10)	0	9,330	4,798	1,700	0,636	7,186	3,861	0,208	0,145	0,177	0,128	0,040	0,019	0,016	0,007
	30	9,956	5,340	1,606	0,847	7,830	4,122	0,218	0,153	0,253	0,184	0,030	0,028	0,019	0,007
	100	8,578	5,102	1,267	0,843	6,866	3,932	0,233	0,157	0,151	0,143	0,041	0,021	0,014	0,007
	300	9,668	5,541	1,489	0,818	7,676	4,385	0,260	0,164	0,183	0,143	0,042	0,023	0,017	0,006
211 (n = 5)	0	9,016	4,996	2,072	0,696	6,386	3,888	0,312	0,202	0,142	0,162	0,080	0,042	0,024	0,012
	30	9,260	5,874	1,602	0,842	7,116	4,676	0,296	0,172	0,158	0,126	0,072	0,038	0,018	0,014
	100	8,758	5,234	1,794	0,810	6,384	4,092	0,286	0,186	0,206	0,106	0,062	0,036	0,020	0,008

Примечание. Здесь и в табл. 2: ЛУС — абсолютное количество крупных неокрашенных клеток с отсутствием активности миелопероксидазы; М — самцы; F — самки; данные представлены в виде средних значений; статистически значимых различий от группы контроля не выявлено (Anova & Dunnett, $p \geq 0,05$), значения не выходят за рамки физиологических норм для данного вида животных.

Note. Here and in the Table 2: LUC — large unstained cell count; M — males; F — females; data are presented as mean values; there were no statistically significant differences from the control group (Anova & Dunnett, $p \geq 0.05$), the values did not go beyond the physiological norms for this animal species.

Таблица 2. Показатели лейкоцитарной формулы у собак ($\times 10^3/\mu\text{л}$)
Table 2. Indicators of the leukocyte formula in dogs ($\times 10^3/\mu\text{l}$)

День Day	Доза Dose	Лейкоциты White blood cells		Нейтрофилы Neutrophils		Лимфоциты Lymphocytes		Моноциты Monocytes		Эозинофилы Eosinophils		ЛУС LUC		Базофилы Basophils	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
91	0 (n = 6)	8,422	9,177	4,738	5,367	2,870	2,860	0,507	0,610	0,248	0,278	0,042	0,045	0,023	0,020
	30 (n = 4)	9,343	9,195	5,443	5,480	3,053	2,880	0,548	0,520	0,235	0,260	0,045	0,038	0,018	0,020
	100 (n = 4)	10,833	8,903	7,190	5,213	2,623	2,850	0,755	0,550	0,215	0,230	0,033	0,035	0,020	0,020
	300 (n = 6)	8,977	10,305	5,167	6,527	2,947	2,728	0,595	0,747	0,198	0,237	0,045	0,047	0,025	0,025
273	0 (n = 6)	8,193	7,287	4,967	3,995	2,390	2,503	0,472	0,388	0,263	0,380	0,030	0,020	0,072	0,043
	30 (n = 4)	8,778	7,903	5,430	4,348	2,543	2,740	0,393	0,353	0,328	0,363	0,030	0,033	0,065	0,068
	100 (n = 4)	6,875	7,433	3,625	4,298	2,543	2,408	0,325	0,423	0,288	0,225	0,028	0,023	0,065	0,060
	300 (n = 6)	8,892	9,017	5,200	5,477	2,815	2,588	0,505	0,518	0,247	0,322	0,040	0,033	0,062	0,080
301	0 (n = 2)	7,065	7,440	4,080	4,300	2,035	2,340	0,440	0,350	0,390	0,360	0,025	0,025	0,090	0,060
	300 (n = 2)	8,640	10,295	5,355	6,805	2,360	2,675	0,465	0,430	0,365	0,210	0,015	0,045	0,065	0,030

Установленные величины в отношении любых нежелательных эффектов NOEL в данном исследовании составили 300 мг/кг/сут как для крыс, так и для собак: в течение всего периода дозирования и последующего периода наблюдения у животных обоих видов не отметили изменений поведения, внешнего вида, массы тела, отклонений результатов лабораторных и инструментальных исследований от нормы, не выявили патоморфологических нарушений. ИПК в экспериментах на животных двух видов даже при длительном введении не оказывал отрицательного влияния на количество эритроцитов, концентрацию гемоглобина, эритроцитарные индексы (МСV, МСН, МСНС), относительное количество ретикулоцитов, количество лейкоцитов и тромбоцитов, относительное количество нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, базофилов, гематокрит, а также на параметры коагулограммы, характеризующие сосудисто-тромбоцитарное и плазменно-коагуляционное звенья гемостаза.

Таким образом, в исследованном диапазоне доз ИПК не приводил к возникновению токсических эффектов, в том числе со стороны системы крови (содержание и характеристики форменных элементов крови, уровень гемоглобина, параметры коагулограммы), что позволяет считать профиль безопасности ИПК обоснованно благоприятным и свидетельствует об отсутствии потенциальных дозозависимых рисков при его длительном применении. Полученные новые результаты по оценке эффектов ИПК в широком диапазоне доз дополняют известные научные данные о благоприятном профиле безопасности ИПК, свидетельствуют об отсутствии мутагенного, генотоксического, цитотоксического действия ИПК, а также подтверждают дальнейшую возможность эмпирического применения противовирусного и противовоспалительного препарата в широкой клинической практике.

Выводы

1. ИПК в широком диапазоне доз не проявляет цитотоксических, мутагенных и генотоксических свойств в стандартных тестах *in vitro* и *in vivo*.

2. В токсикологическом исследовании при многократном пероральном введении в течение 26 нед крысам и в течение 39 нед собакам для ИПК не установлено негативное влияние на поведение, функциональные и морфологические параметры животных.

3. Не выявлено отрицательное влияние ИПК на количество и характеристики эритроцитов, уровень гемоглобина, лейкоцитарную формулу, а также сосудисто-тромбоцитарное и плазменно-коагуляционное звенья гемостаза.

4. NOEL ИПК соответствовала максимально вводимой дозе и составила 300 мг/кг/сут.

5. Системная экспозиция ИПК при введении в дозе 300 мг/кг/сут крысам и собакам превышала возможную у человека в 8–10 и в 41–65 раз соответственно.

6. Профиль безопасности ИПК при длительном применении является обоснованно благоприятным.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Kalinina N.A., Shtro A.A., Belyaevskaya S.V., Slita A.V., et al. Activity of ingavirin (6-[2-(1H-Imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxo-hexanoic acid) against human respiratory viruses in *in vivo* experiments. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011; 4(12): 1518–34. <https://doi.org/10.3390/ph4121518>
- Malík I., Kováč G., Padrtová T., Hudecová L. Ingavirin might be a promising agent to combat Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Ceska Slov. Farm.* 2020; 69(3): 107–11.
- Шишкина Л.Н., Небольсин В.Е., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Эрдынесова У.Б., Мазуркова Н.А. и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А(H1N1/09)V. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010; 55(3-4): 12–6.
- Логинова С.Я., Борисевич С.В., Семенова И.А., Борисевич Г.В., Максимов В.А., Бондарев В.П. и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении возбудителя гриппа В. *Антибиотики и химиотерапия*. 2009; 54(7-8): 13–5.
- Логинова С.Я., Борисевич С.В., Щукина В.Н., Лыков М.В., Борисевич Г.В., Бондарев В.П. и др. Изучение противовирусной активности ингавирина® в отношении возбудителя «мексиканского» пандемического гриппа А/H1N1/2009 *in vitro* и *in vivo*. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010; 55(11-12): 17–21.
- Зарубаев В.В., Гаршинина А.В., Калинина Н.А., Беляевская С.В., Небольсин В.Е., Киселев О.И. и др. Лечение экспериментальной парагриппозной пневмонии у сирийских хомячков при помощи Ингавирина. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(2): 35–40.
- Логинова С.Я., Борисевич С.В., Лыков М.В., Веденина Е.В., Борисевич Г.В., Бондарев В.П. и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении «Мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы А/California/04/2009 и А/California/07/2009. *Антибиотики и химиотерапия*. 2009; 54(3-4): 15–7.
- Исаева Е.И., Небольсин В.Е., Козулина И.С., Морозова О.В. Изучение противовирусной активности Ингавирина® *in vitro* в отношении метапневмовируса человека. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(1): 34–8.
- Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А., Бондарев В.П., Небольсин В.Е. Эффективность Ингавирина® *in vitro* в отношении возбудителя аденовирусной инфекции. *Антибиотики и химиотерапия*. 2009; 54(7-8): 16–8.
- Логинова С.Я., Борисевич С.В., Семенова И.В., Максимов В.А., Бондарев В.П., Небольсин В.Е. Изучение противовирусной активности Ингавирина® в отношении возбудителя гриппа А(H3N2) *in vitro*. *Антибиотики и химиотерапия*. 2009; 54(9-10): 23–6.
- Зарубаев В.В., Беляевская С.В., Сироткин А.К., Анфимов П.М., Небольсин В.Е., Киселев О.И. и др. Влияние Ингавирина® *in vitro* и *in vivo* на ультраструктуру и инфекционность вируса гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(5): 21–5.
- Шишкина Л.Н., Небольсин В.Е., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Мазуркова Н.А., Сергеев А.А. и др. Эффективность Ингавирина® *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов

- пандемического вируса гриппа А(H1N1/09)v. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; (2): 93–6.
13. Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Бурова О.С., Соколова З.А. Сигнальные TLR/RLR-механизмы иммуномодулирующего действия препаратов ингавирин и тимоген. *Российский биотерапевтический журнал*. 2019; 18(1): 60–6. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66>
 14. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «Ридостин», «Циклоферон» и «Ингавирин». *Цитокины и воспаление*. 2015; 14(2): 26–34.
 15. Моисеева И.Я., Зиновьев А.И., Кустикова И.Н., Филимонов С.А. Влияние препарата «Дикарбамин» на лейкоцитарный состав периферической крови в условиях экспериментального костномозгового синдрома. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2008; (4): 17–24.
 16. Моисеева И.Я., Зиновьев А.И., Мозерова И.В., Филимонов С.А. Влияние дикарбамина на пострадиационную динамику лейкоцитарного состава периферической крови мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2010; 73(1): 20–2.
 17. Моисеева И.Я., Ионичева Л.В., Никишин С.А., Зиновьев А.И., Небольсин В.Е. Модификация гематосупрессивного действия ионизирующего излучения дикарбамином. *Вопросы онкологии*. 2013; 59(1): 99–104.
 18. Моисеева И.Я., Зиновьев А.И., Ионичева Л.В., Никишин С.А., Небольсин В.Е., Кинзирская Ю.В. Влияние дикарбамина на костномозговое кроветворение в условиях экспериментального пострадиационного костномозгового синдрома. *Вопросы онкологии*. 2012; 58(5): 663–6.
 19. Моисеева И.Я., Никишин С.А., Водопьянова О.А., Ионова С.А., Небольсин В.Е. Сравнительное исследование миелопротекторной эффективности дикарбамина в различных дозах и режимах введения в условиях экспериментального пострадиационного костномозгового синдрома. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; (2): 54.
 20. Моисеева И.Я., Ионичева Л.В., Никишин С.А., Родина О.П., Водопьянова О.А., Небольсин В.Е. Сравнительное исследование миелопротекторного эффекта дикарбамина и лейкостима в условиях экспериментального пострадиационного костномозгового синдрома. *Вопросы онкологии*. 2013; 59(4): 498–504.
 21. Райхлин Н.Т., Андропова Н.В., Седакова Л.А., Гаджиева С.Ш., Смирнова Е.А., Власенкова Н.К. и др. Препарат дикарбамин вызывает дифференцировку опухолевых клеток эритробластога Френд с образованием элементов лимфоидного миелоидного и эритроидного ряда. *Российский биотерапевтический журнал*. 2005; 4(3): 80–6.
 22. Nair A., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 2016; 7(2): 27.
 23. Гордеев И.Г., Казей В.И., Капашин А.В., Лучинкина Е.Е., Глобенко А.А., Владыкин А.Л. и др. Фармакокинетика имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты у здоровых добровольцев. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021; 66(1-2): 19–25.
- REFERENCES
1. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Kalinina N.A., Shtro A.A., Belyaevskaya S.V., Slita A.V., et al. Activity of ingavirin (6-[2-(1H-Imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxo-hexanoic acid) against human respiratory viruses in *in vivo* experiments. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011; 4(12): 1518–34. <https://doi.org/10.3390/ph4121518>
 2. Malik I., Kovac G., Padrtova T., Hudcovova L. Ingavirin might be a promising agent to combat Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Ceska Slov. Farm.* 2020; 69(3): 107–11.
 3. Shishkina L.N., Nebol'sin V.E., Kabanov A.S., Skarnovich M.O., Erdyneeva U.B., Mazurkova N.A., et al. *In vitro* efficacy of Ingavirin against the pandemic influenza virus A(H1N1/09)v. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010; 55(3-4): 12–6. (in Russian)
 4. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Semenova I.A., Borisevich G.V., Maksimov V.A., Bondarev V.P., et al. *In vitro* investigation of Ingavirin efficacy against influenza B virus. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2009; 54(7-8): 13–5. (in Russian)
 5. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Shchukina V.N., Lykov M.V., Borisevich G.V., Bondarev V.P., et al. Study of Ingavirin antiviral activity against Mexican pandemic influenza virus A/H1N1/2009 *in vitro* and *in vivo*. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010; 55(11-12): 17–21. (in Russian)
 6. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Kalinina N.A., Belyaevskaya S.V., Nebol'sin V.E., Kiselev O.I., et al. Ingavirin treatment of experimental parainfluenza pneumonia in Syrian hamsters. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(2): 35–40. (in Russian)
 7. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Lykov M.V., Vedenina E.V., Borisevich G.V., Bondarev V.P., et al. *In vitro* efficacy of Ingavirin against the Mexican pandemic subtype H1N1 of influenza A virus, strains A/California/04/2009 and A/California/07/2009. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2009; 54(3-4): 15–7. (in Russian)
 8. Isaeva E.I., Nebol'sin V.E., Kozulina I.S., Morozova O.V. *In vitro* investigation of the antiviral activity of Ingavirin against human metapneumovirus. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(1): 34–8. (in Russian)
 9. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Maksimov V.A., Bondarev V.P., Nebol'sin V.E. *In vitro* Ingavirin efficacy against adenoviral infection pathogen. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2009; 54(7-8): 16–8. (in Russian)
 10. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Semenova I.V., Maksimov V.A., Bondarev V.P., Nebol'sin V.E. *In vitro* activity of Ingavirin against influenza virus A (H3N2). *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2009; 54(9-10): 23–6. (in Russian)
 11. Zarubaev V.V., Belyaevskaya S.V., Sirotkin A.K., Anfimov P.M., Nebol'sin V.E., Kiselev O.I., et al. *In vitro* and *in vivo* effects of ingavirin on the ultrastructure and infectivity of influenza virus. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(5): 21–5. (in Russian)
 12. Shishkina L.N., Nebol'sin V.E., Kabanov A.S., Skarnovich M.O., Mazurkova N.A., Sergeev A.A., et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of Ingavirin against strains of pandemic influenza virus A(H1N1/09)v. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; (2): 93–6. (in Russian)
 13. Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Burova O.S., Sokolova Z.A. Signaling TLR/RLR-mechanisms of immunomodulating action of ingavirin and thymogen preparations. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2019; 18(1): 60–6. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66> (in Russian)
 14. Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs ridostin, cycloferon and ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie*. 2015; 14(2): 26–34. (in Russian)
 15. Moiseeva I.Ya., Zinov'ev A.I., Kustikova I.N., Filimonov S.A. The effect of the drug «Dicarbamine» on the leukocyte composition of peripheral blood in the conditions of experimental bone marrow syndrome. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki*. 2008; (4): 17–24. (in Russian)
 16. Moiseeva I.Ya., Zinov'ev A.I., Mozerova I.V., Filimonov S.A. Effect of drug dicarbamin on postradiation leukocyte composition dynamics in the peripheral blood of mice. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2010; 73(1): 20–2. (in Russian)
 17. Moiseeva I.Ya., Ionicheva L.V., Nikishin S.A., Zinov'ev A.I., Nebol'sin V.E. Modification of the hematosuppressive effect of ionizing radiation with dicarbamine. *Voprosy onkologii*. 2013; 59(1): 99–104. (in Russian)
 18. Moiseeva I.Ya., Zinov'ev A.I., Ionicheva L.V., Nikishin S.A., Nebol'sin V.E., Kinzirskaia Yu.V. Influence of dicarbamine on medullary hemopoiesis in condition of experimental postirradiation

- ation bone-marrow syndrome. *Voprosy onkologii*. 2012; 58(5): 663–6. (in Russian)
19. Moiseeva I.Ya., Nikishin S.A., Vodop'yanova O.A., Ionova S.A., Nebol'sin V.E. Comparative study of mieloprotective efficiency of dicarbamine in different doses and dosing regimens in conditions of experimental post-radiation bone-marrow syndrome. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (2): 54. (in Russian)
20. Moiseeva I.Ya., Ionicheva L.V., Nikishin S.A., Rodina O.P., Vodop'yanova O.A., Nebol'sin V.E. A comparative study of mieloprotection effect of dicarbamine and leucostim in conditions of experimental post-radiation bone marrow syndrome. *Voprosy onkologii*. 2013; 59(4): 498–504. (in Russian)
21. Raykhlin N.T., Andronova N.V., Sedakova L.A., Gadzhieva S.Sh., Smirnova E.A., Vlasenkova N.K., et al. The drug dicarbamine causes differentiation of erythroblastosis friend tumor cells with the formation of lymphoid, myeloid and erythroid elements. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2005; 4(3): 80–6. (in Russian)
22. Nair A., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 2016; 7(2): 27.
23. Gordeev I.G., Kazey V.I., Kapashin A.V., Luchinkina E.E., Globenko A.A., Vladykin A.L., et al. Pharmacokinetics of pentanedioic acid imidazolylethanamide in healthy volunteers. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2021; 66(1-2): 19–25. (in Russian)

Информация об авторах

Джайн Екатерина Александровна[✉] — руководитель группы доклинических исследований АО «Валента Фарм», Москва, Россия, ekaterina.korsakova@valentapharm.com, <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>

Pleimes Dirk — managing director and chief medical officer, Myelo Therapeutics GmbH, Берлин, Германия, <https://orcid.org/0000-0002-0876-9418>

Глобенко Александр Александрович — к.м.н., медицинский директор АО «Валента Фарм», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>

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 08.07.2021;
принята к публикации 14.09.2021;
опубликована 30.10.2021

Information about the authors

Ekaterina A. Jain[✉] — Head, Preclinical research group, JSC Valenta Pharm pharmaceutical company, Moscow, Russia, ekaterina.korsakova@valentapharm.com, <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>

Dirk Pleimes — managing director and chief medical officer, Myelo Therapeutics GmbH, Berlin, Germany, <https://orcid.org/0000-0002-0876-9418>

Aleksander A. Globenko — Cand. Sci. (Med.), Medical director, JSC Valenta Pharm pharmaceutical company, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>

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 08.07.2021;
accepted for publication 14.09.2021;
published 30.10.2021

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-118>

Определение возможной мишени действия 4,4а-дигидроксантонов в бактериальных клетках

Фролова В.В.^{1✉}, Чернов Н.М.¹, Ивкин Д.Ю.¹, Румянцев А.М.², Гурина С.В.¹¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия;²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. В настоящее время интенсивно изучаются частично гидрированные производные ксантона — дигидроксантоны (ДК). Они представляют интерес в связи с тем, что обладают антимикробным, противоопухолевым, антиоксидантным действием. Много работ посвящено исследованию цитотоксичности ДК и совсем немного сведений об их антимикробной активности.

В связи с этим актуальным является исследование антимикробной активности и механизма действия новых синтетических производных 4,4а-ДК. В предварительных исследованиях установлено, что 4,4а-ДК активны в отношении грамположительных бактерий и обладают выраженным противостафилококковым действием. Выявлено наиболее активное производное — 5-бром-4,4-диметил-7-хлор-4,4а-ДК (БДХ-ДК).

Цель исследования — определить возможную мишень действия активного производного БДХ-ДК в бактериальных клетках, а также его острую токсичность.

Материалы и методы. Для доказательства воздействия БДХ-ДК на проницаемость цитоплазматической мембраны в бактериальных клетках был использован метод измерения интенсивности поглощения клетками бактерий красителя кристаллического фиолетового. С целью определения влияния БДХ-ДК на процесс синтеза белка было проведено исследование плазмокоагулазной активности *Staphylococcus aureus* под действием ДК. Для изучения действия БДХ-ДК на бактериальную ДНК использовали метод расщепления плазмидной ДНК. Острую токсичность БДХ-ДК определяли по экспресс-методу В.Б. Прозоровского.

Результаты. БДХ-ДК вызывал повышение проницаемости цитоплазматической мембраны *S. aureus*, не влиял непосредственно на плазмокоагулазную активность *S. aureus* и проявлял слабое повреждающее действие на бактериальную ДНК. Соединение индуцировало разрывы в плазмидной ДНК в очень высокой концентрации — 1 мМ, или 384 мкг/мл и выше. БДХ-ДК относится к малотоксичным соединениям (средняя летальная доза при пероральном введении соединения составила 1710 ± 170 мг/кг, при внутривенном — $116,9 \pm 13,3$ мг/кг).

Заключение. Впервые были проведены углублённые исследования возможного механизма действия нового синтетического биологически активного соединения из группы 4,4а-ДК — БДХ-ДК. Установлено, что вероятной мишенью действия БДХ-ДК в клетках *S. aureus* является цитоплазматическая мембрана. БДХ-ДК не влиял на процесс синтеза белка, а именно на активность фермента плазмокоагулазы. Соединение не оказывало выраженного повреждающего действия на бактериальную ДНК. Установлено, что 4,4а-ДК относится к малотоксичным соединениям.

Ключевые слова: 4,4а-дигидроксантоны, острая токсичность, мишень действия, бактериальные клетки, проницаемость цитоплазматической мембраны, плазмокоагулирующая способность стафилококка, действие на плазмидную ДНК

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

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

Для цитирования: Фролова В.В., Чернов Н.М., Ивкин Д.Ю., Румянцев А.М., Гурина С.В. Определение возможной мишени действия 4,4а-дигидроксантонов в бактериальных клетках. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(5):558–566.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-118>

Identifying possible target of action of 4,4a-dihydroxanthones in bacterial cells

Valeriya V. Frolova¹✉, Nikita M. Chernov¹, Dmitry Yu. Ivkin¹,
Andrey M. Rumyantsev², Svetlana V. Gurina¹

¹Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia;

²Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Partially hydrogenated derivatives of xanthone, dihydroxanthones, are being intensively studied. They are of interest due to their antimicrobial, antitumor, and antioxidant effects. Many researches are focused on the study of the cytotoxicity of dihydroxanthones and very little information is available on their antimicrobial activity. Therefore, the study of the antimicrobial activity and mechanism of action of new synthetic derivatives of 4,4a-dihydroxanthone is relevant. Preliminary studies have demonstrated that 4,4a-dihydroxanthones are active against gram-positive bacteria and have a pronounced anti-staphylococcal effect. Namely, 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone (BDC-DX) was shown to be the most active derivative.

Aim of the study was to determine the possible target of action of the active derivative of BDC-DX in bacterial cells and its acute toxicity.

Materials and methods. The method of measuring the intensity of absorption of the crystal violet dye by bacteria cells was used to prove the effect of BDC-DX on the permeability of the cytoplasmic membrane in bacterial cells. The plasma coagulase activity of *Staphylococcus aureus* was tested under the action of dihydroxanthone to determine the effect of dihydroxanthone on the process of protein synthesis. Plasmid DNA digestion method was used to study the effect of the compound on bacterial DNA. The acute toxicity of BDC-DX was determined by the express method of V.B. Prozorovsky.

Results and discussion. BDC-DX increased the permeability of the cytoplasmic membrane of *S. aureus*. Dihydroxanthone did not directly affect the plasma coagulase activity of *Staphylococcus* and showed a weak damaging effect on bacterial DNA. The compound induced breaks in plasmid DNA at a very high concentration — 1 mM or 384 µg/ml and higher. BDC-DX is a low-toxic compound (the average lethal dose for oral administration of the compound is 1710 ± 170 mg/kg, the average lethal dose for intraperitoneal administration of the compound is 116.9 ± 13.3 mg/kg).

Conclusion. For the first time, in-depth study of the possible mechanism of action of a new synthetic biologically active compound from the group of 4,4a-dihydroxanthones, BDC-DX, was conducted. A likely target of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone in *S. aureus* cells is the cytoplasmic membrane. BDC-DX did not affect the process of protein synthesis, namely the activity of the plasma coagulase enzyme. The compound had no pronounced damaging effect on bacterial DNA. It was found that 4,4a-dihydroxanthone refers to low-toxic compounds.

Keywords: 4,4a-dihydroxanthones, acute toxicity, target of action, bacterial cells, permeability of the cytoplasmic membrane, plasma coagulating ability of *Staphylococcus*, action on plasmid DNA

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: Frolova V.V., Chernov N.M., Ivkin D.Yu., Rumyantsev A.M., Gurina S.V. Identifying possible target of action of 4,4a-dihydroxanthones in bacterial cells. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):558–566.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-118>

Введение

Ксантоны представляют собой многочисленную группу биологически активных веществ природного происхождения (встречаются у грибов, растений, лишайников) и обладают различными биологическими эффектами (антибактериальным, противогрибковым, противомаларийным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антигистаминным) [1–3].

В настоящее время интенсивно изучаются частично гидрированные производные ксантона —

дигидроксантоны (ДК), которые, как и ксантоны, являются вторичными метаболитами растений, грибов и бактерий. Многие производные ДК получают путём химического синтеза. Химически синтезированные производные ДК представляют интерес в связи с тем, что они, как и природные, обладают антимикробным, противоопухолевым, антиоксидантным действием [4–6]. Кроме того, устойчивость бактерий к антимикробным препаратам, получаемым химическим синтезом, развивается, как правило, медленнее, чем к препаратам природного происхождения.

Интерес, вызванный биологическими свойствами ДК, привёл к росту числа работ по выделению и синтезу их производных [1–3]. Много работ посвящено исследованию цитотоксичности ДК и совсем немного сведений об их антимикробной активности.

В связи с этим актуальным является исследование антимикробной активности и механизма действия новых производных 4,4а-ДК.

В предварительных исследованиях установлено, что 4,4а-ДК с разными заместителями в ароматическом кольце, синтезированные на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, активны в отношении грамположительных бактерий и обладают выраженным противостафилококковым действием. Выявлено наиболее активное производное — 5-бром-4,4-диметил-7-хлор-4,4а-ДК (БДХ-ДК) (рис. 1) [6].

Цель данного исследования — определить возможную мишень действия активного производного БДХ-ДК в бактериальных клетках, а также его острую токсичность.

Для многих антибактериальных агентов мишенями действия могут быть клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, нуклеиновые кислоты, процессы синтеза белка [7–9].

Для выяснения возможного механизма действия БДХ-ДК исследовали его влияние на проницаемость цитоплазматической мембраны бактериальных клеток, процесс синтеза белка (по изменению активности фермента плазмокоагулазы) и на бактериальную ДНК.

Материалы и методы

Определение интенсивности поглощения красителя кристаллического фиолетового бактериальными клетками

Изменение в поглощении клетками *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922 красителя кристаллического фиолетового (КФ) после взаимодействия с ДК определяли по методике S. Halder и соавт. [10].

Культуры *S. aureus* и *E. coli* выращивали на мясо-пептонном агаре 24 ч. Клетки суспендировали в изотоническом растворе NaCl до 10^9 КОЕ/мл. Полученный инокулят добавляли к раствору исследуемого соединения в соотношении 1 : 1 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Концентрации ДК в пробах составляли 2; 4; 8; 16; 32; 62,5; 125 и 250 мкг/мл. В качестве контроля использовали суспензию клеток *S. aureus* и *E. coli*, не подвергшуюся действию соединения. Затем к исследуемым образцам добавляли КФ, его концентрация в смеси составляла 0,01 мг/мл. Инкубировали 10 мин, затем центрифугировали 8 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость

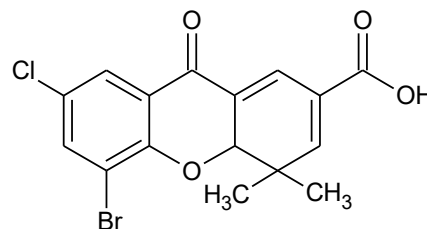


Рис. 1. Строение БДХ-ДК.

Fig. 1. 5-Bromine-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone.

отделяли и определяли оптическую плотность при длине волны 590 нм на спектрофотометре.

Для получения достоверных результатов эксперименты проводили в 3 повторностях. Значение оптической плотности исходного раствора КФ принимали за 100%. Содержание красителя в клетках бактерий вычисляли по формуле:

$$\frac{A_{\text{оп}}}{A_{100}} \times 100,$$

где $A_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытной пробы; A_{100} — оптическая плотность пробы с красителем в отсутствие клеток.

Определение плазмокоагулазной активности *S. aureus* под действием БДХ-ДК

Для определения действия БДХ-ДК на активность образования фермента плазмокоагулазы *S. aureus* ATCC 6538 использовали метод, основанный на образовании фибрина в цитратной плазме кролика под воздействием фермента [11]. Цитратную плазму разводили 0,9% раствором NaCl в соотношении 1 : 5, к 0,5 мл полученного раствора добавляли исследуемое соединение в соотношении 1 : 1 в субстатической (1 мкг/мл) и статической (2 мкг/мл) концентрациях и инокулят стафилококка (10^5 КОЕ/мл), инкубировали 3 ч при 37°C, затем определяли оптическую плотность образовавшегося сгустка фибрина на фотометре «Эксперт-003». Отсутствие свертывания плазмы на протяжении 24 ч оценивали как отрицательный результат реакции. Положительным результатом реакции считали образование сгустков фибрина. Контролем служила плазма с инокулятом без ДК. Для подсчета выживших клеток при действии разных концентраций исследуемого соединения делали высевы на мясо-пептонный агар. Определяли удельную активность образования фермента ($A_{\text{уд}}$) по формуле:

$$A_{\text{уд}} = \frac{A_i}{K_i},$$

где A_i — значение оптической плотности образовавшегося сгустка; K_i — количество выживших клеток, которое выражали в виде десятичного логарифма (lg).

Выделение плазмиды pBR322

Выделение плазмидной ДНК pBR322 осуществляли из клеток *E. coli*, которые ранее подвергались трансформации¹.

Бактериальные клетки ресуспензировали в трис-ацетатном буфере, содержащем РНКазу А (250 мкл). К полученной суспензии добавляли 250 мкл буферного раствора NaOH/SDS (додецилсульфат натрия), в котором разрушались при активном перемешивании компоненты клеточной стенки, приводя к лизису клетки и высвобождению клеточных компонентов. Смесь клеток и реагентов перемешивали до тех пор, пока она не становилась прозрачной. К полученному раствору добавляли 250 мкл кислого ацетата калия для нейтрализации, перемешивали до образования творожистой взвеси. Для отделения осадка смесь центрифугировали в течение 10 мин на максимальной скорости. Осуществляли сорбцию ДНК в специальных спин-колонках. После фильтрации раствора промывали колонку, а затем элюировали очищенную ДНК. Концентрацию полученной ДНК определяли на спектрофотометре при 260 нм.

Анализ расщепления плазмидной ДНК

Способность БДХ-ДК индуцировать повреждение ДНК была проанализирована с помощью анализа расщепления плазмиды pBR322 [12].

1 мкг плазмидной ДНК разводили в 6 мкл воды. К пробам добавляли 14 мкл раствора вещества в диметилсульфоксиде таким образом, чтобы его итоговые концентрации составляли 0,125; 0,25; 0,5; 1 и 2 мМ. Суммарный объем пробы составлял 20 мкл, а концентрация ДМСО — 70%. Пробы инкубировали при 37°C в термостате в течение 16 ч [12].

Анализировали состояние плазмидной ДНК с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Снимки были сделаны с помощью системы ChemiDoc MP system («BioRad»). Эксперименты проводили в 3 повторностях.

В качестве сравнения было взято вещество, вызывающее разрывы в ДНК — эндиин, синтезированный в Институте химии СПбГУ [12].

Определение острой токсичности БДХ-ДК

Острую токсичность исследуемого соединения определяли в опытах на белых нелинейных мышцах-самцах массой 20–25 г. БДХ-ДК вводили однократно, перорально и внутривенно в интервале доз 50–2000 мг/кг в виде водной суспензии с использованием в качестве солюбилизатора Твина-80. Выживаемость животных определяли, наблюдая за ними в течение 14 дней от момента введения исследуемых соединений. Регистрировали развитие

основных симптомов и время гибели животных в течение 24 ч. Расчет средней летальной дозы (LD_{50}) ДК проводили по экспресс-методу В.Б. Прозоровского [13]. Степень токсичности соединения определяли по классификации Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова [14–16].

Результаты и обсуждение

Влияние БДХ-ДК на проницаемость бактериальной мембраны

Из данных литературы известно, что производные ксантона, проявляющие антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий, нарушают проницаемость их цитоплазматической мембраны [17–21].

Данный механизм был доказан в исследованиях, которые проводили с использованием флуоресцентного метода с пропидием йодидом и с помощью реагента SYTOX Green. Реагент SYTOX Green и пропидий йодид не способны проникать в живые клетки с неповрежденными цитоплазматическими мембранами, но легко проникают в клетки с поврежденными мембранами. В экспериментах с пропидием йодидом было доказано, что природный ксантон — α -мангостин, выделенный из *Garcinia mangostana*, и его полусинтетические производные повреждают мембраны клеток *S. aureus*, приводя к потере внутриклеточных компонентов [17, 19, 20]. При действии ксантонов, полученных химическим синтезом, на *S. aureus* реагент SYTOX Green проникал в бактериальные клетки, что свидетельствовало о повреждении клеточной мембраны *S. aureus* [18, 21].

Для обнаружения повреждения бактериальной мембраны химическими соединениями используют также КФ [10], который относится к ионным основным красителям и используется в методах простого и дифференциального окрашивания прокариотических клеток [22]. КФ плохо проникает через неповрежденную мембрану бактериальных клеток, но лучше проникает в клетки, если их мембрана повреждена [8, 10].

Изменения проницаемости мембраны *S. aureus* оценивали по степени поглощения клетками красителя КФ после обработки БДХ-ДК. Чем больше красителя поглощается клетками, тем выше их проницаемость. В качестве препарата сравнения использовали катионное поверхностно-активное вещество — хлоргексидина биглюконат (ХГБ) в цидных для *S. aureus* концентрациях 2–250 мкг/мл, действующий на проницаемость мембран микробных клеток [23].

При воздействии ДК в концентрациях, ингибирующих размножение *S. aureus* (2–250 мкг/мл), процентное содержание КФ в бактериальных клетках достоверно увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 2).

¹ Lysis of bacterial cell for plasmid purification.
URL: <https://www.csun.edu/~11656883/labs/instruction2.pdf>

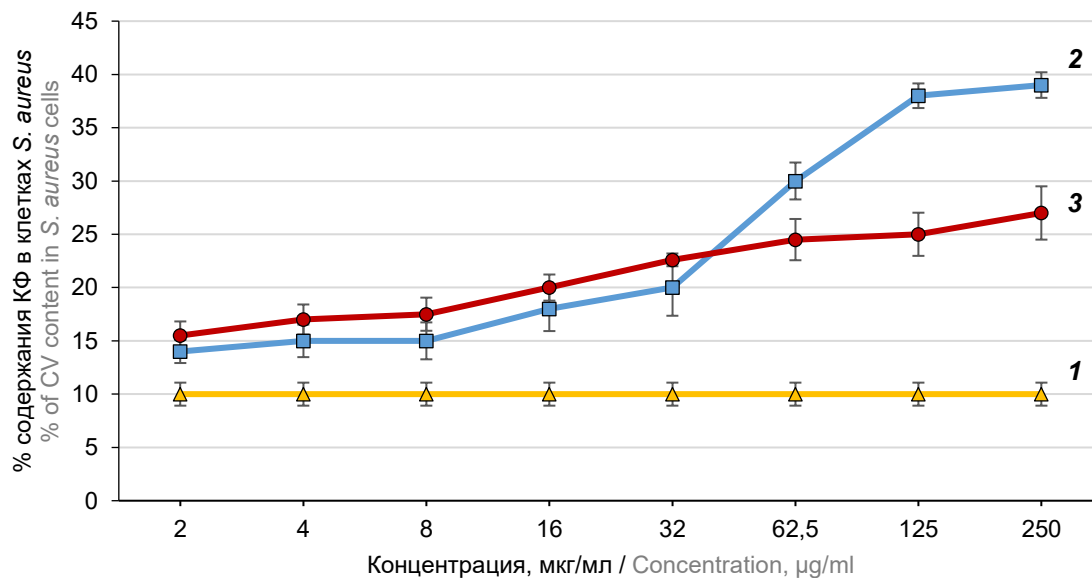


Рис. 2. Сравнительная характеристика интенсивности поглощения КФ клетками *S. aureus* при действии БДХ-ДК.

1 — контроль; 2 — хлоргексидина биглюконат; 3 — ДК.

Fig. 2. Comparative characteristics of the intensity of absorption of crystal violet (CV) by *S. aureus* cells under the action of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone.

1 — control; 2 — chlorhexidine bigluconate; 3 — dihydroxanthone.

При сравнении действия БДХ-ДК и ХГБ показано, что интенсивность поглощения КФ клетками *S. aureus* при ингибирующих концентрациях ДК (2–32 мкг/мл) была сопоставима с эффектом ХГБ (рис. 2).

Таким образом, при действии БДХ-ДК на клетки *S. aureus* достоверно увеличивалась интенсивность поглощения красителя КФ. Процент поглощения зависел от концентрации соединения: чем выше действующая концентрация ДК, тем выше процент поглощения красителя (рис. 2).

При исследовании антибактериальной активности 4,4a-ДК установлено, что данные соединения эффективны в отношении грамположительных бактерий и малоактивны в отношении грамотрицательных [6].

Для сравнения результатов интенсивности поглощения красителя клетками грамположительной культуры *S. aureus* и грамотрицательной *E. coli* культуру *E. coli* также подвергали действию разных концентраций БДХ-ДК. В качестве контроля использовали клетки *E. coli*, не подвергшиеся действию исследуемых веществ.

ДК в цидной для *E. coli* концентрации (250 мкг/мл) практически не вызывал повышения поглощения красителя клетками по сравнению с контролем. При воздействии ХГБ на клетки *E. coli* в цидных концентрациях 32; 62,5; 125 и 250 мкг/мл процентное содержание КФ в клетках достоверно увеличилось с 6% (контроль) до 10, 11, 15 и 17% соответственно, что свидетельствовало о повышении проницаемости бактериальных клеток под действием ХГБ (рис. 3).

Полученные данные свидетельствует о том, что мембрана *E. coli* не подвергается действию ДК.

Увеличение интенсивности поглощения красителя КФ клетками *S. aureus* при воздействии БДХ-ДК может быть свидетельством повышения проницаемости его цитоплазматической мембраны. На основании этих результатов можно считать, что вероятной мишенью действия БДХ-ДК является цитоплазматическая мембрана стафилококка.

Определение влияния БДХ-ДК на плазмокоагулазную активность *S. aureus*

Плазмокоагулаза — фермент, вызывающий свёртывание плазмы крови, является фактором патогенности стафилококков [24]. Для определения действия БДХ-ДК на активность образования фермента плазмокоагулазы *S. aureus* в плазму крови добавляли суспензию бактериальных клеток (10^5 КОЕ/мл) и ДК в концентрациях 1 мкг/мл (субстатической) и 2 мкг/мл (статической), инкубировали 3 ч при 37°C. Образование сгустков наблюдали во всех образцах, но интенсивность их была разной.

Интенсивность образования сгустков белков плазмы зависела от концентрации ДК и количества выживших клеток *S. aureus*. Чем больше оставалось живых клеток после действия ДК, тем выше была оптическая плотность (A_{λ}) сгустков белков плазмы. При концентрациях ДК 2 и 1 мкг/мл количество выживших клеток (K_1) составляло 10^3 и 10^5 КОЕ/мл соответственно (таблица).

Удельная активность образования фермента ($A_{уд}$) в присутствии исследуемых концентраций

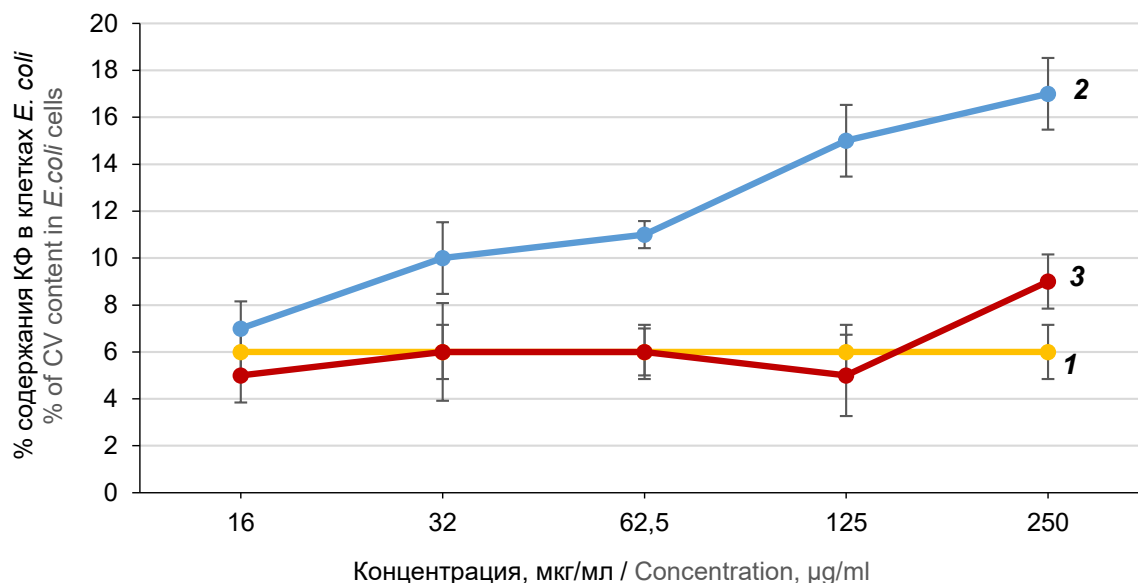


Рис. 3. Сравнительная характеристика интенсивности поглощения КФ клетками *E. coli* при действии БДХ-ДК.
1 — контроль; 2 — хлоргексидина биглюконат; 3 — ДК.

Fig. 3. Comparative characteristics of the intensity of absorption of crystal violet (CV) by *E. coli* cells under the action of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone.
1 — control; 2 — chlorhexidine bigluconate; 3 — dihydroxanthone.

ДК и в контроле оказалась на одном уровне — 0,04 (таблица).

Установлено, что ДК не влияет непосредственно на плазмокоагулазную активность стафилококка, которая зависела от концентрации выживших клеток.

Исследование действия БДХ-ДК на бактериальную ДНК

Способность БДХ-ДК вызывать разрывы в молекулах ДНК была проанализирована с помощью анализа расщепления плазмиды pBR322 [12].

При действии БДХ-ДК в концентрации 1 мМ (384 мкг/мл) на плазмидную ДНК pBR322 происходило уменьшение фракции сверхспирализованной ДНК и увеличение фракции плазмидной ДНК в ослабленной конформации, что свидетельствовало о появлении однопочечных разрывов в молекулах плазмидной ДНК. Препарат сравнения эндин вызывал разрывы в плазмидной ДНК в значительно более низкой концентрации — 0,125 мМ (рис. 4).

Таким образом, БДХ-ДК вызывает разрывы в плазмидной ДНК в очень высокой концентрации: 1 мМ или 384 мкг/мл и выше, что свидетельствует о слабом повреждающем действии соединения на бактериальную ДНК.

Определение острой токсичности БДХ-ДК

БДХ-ДК вводили мышам перорально и внутривенно [13]. При пероральном введении соединения LD_{50} составила 1710 ± 170 мг/кг, при внутривенном — $116,9 \pm 13,3$ мг/кг. Таким образом, установлено, что БДХ-ДК по классификации Hodge и Sterner [14, 16] и классификации К.К. Сидорова [15, 16] относится к малотоксичным соединениям.

Заключение

Впервые были проведены углублённые исследования возможного механизма действия нового синтетического биологически активного соединения из группы 4,4а-ДК — БДХ-ДК. Установлено, что вероятной мишенью действия БДХ-ДК в клет-

Удельная активность образования фермента ($A_{уд}$) при разных концентрациях БДХ-ДК

Specific activity of enzyme formation (A_s) at different concentrations of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone

Вариант опыта / Experiment design	A_i	K_i	$A_{уд} / A_s$
Плазма крови + суспензия <i>S. aureus</i> (10^5 КОЕ/мл) + ДК (2 мкг/мл) Blood plasma + <i>S. aureus</i> suspension (10^5 CFU/ml) + dihydroxanthone (2 µg/ml)	0,114	10^3	0,038
Плазма крови + суспензия <i>S. aureus</i> (10^5 КОЕ/мл) + ДК (1 мкг/мл) Blood plasma + <i>S. aureus</i> suspension (10^5 CFU/ml) + dihydroxanthone (1 µg/ml)	0,2	10^5	0,04
Контроль / Control	0,21	10^5	0,042

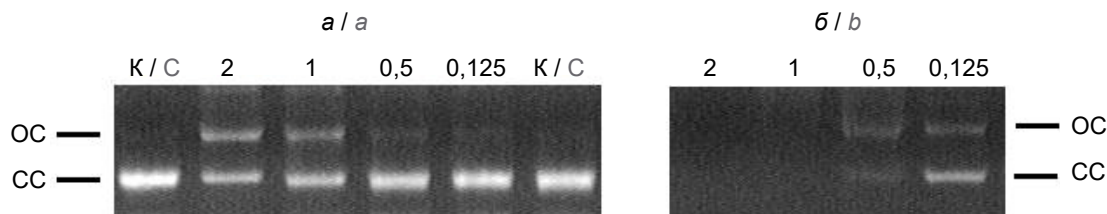


Рис. 4. Электрофореграммы плазмидной ДНК pBR322 после инкубирования в присутствии различных концентраций (мМ) ДХ (а) и ендиина (б).

CC — фракция сверхспирализованной ДНК; OC — фракция плазмидной ДНК в расслабленной конформации; К — контроль.

Fig. 4. Electrophoregrams of pBR322 plasmid DNA after incubation in the presence of various concentrations (mM) of dihydroxanthone (a) and enediine (b).

CC — fraction of supercoiled DNA; OC — fraction of plasmid DNA in a relaxed conformation; C — control.

ках *S. aureus* является цитоплазматическая мембрана. БДХ-ДК не влиял на процесс синтеза белка, а именно на активность фермента плазмокоагулазы. Соединение не оказывало выраженного повреждающего действия на бактериальную ДНК. Установлено, что БДХ-ДК относится к малотоксичным соединениям. Данных о механизмах антимикробной активности соединений группы 4,4а-ДК в доступной литературе мы не обнаружили.

Таким образом, определён возможный механизм антибактериального действия синтетического производного 4,4а-ДК — БДХ-ДК. Данное соединение можно рекомендовать для дальнейших исследований в целях использования в качестве активной фармацевтической субстанции в составе антимикробного лекарственного препарата.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Pinto M.M.M., Sousa M.E., Nascimento M.S.J. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12(21): 2517–38. <https://doi.org/10.2174/092986705774370691>
- Masters K. S., Bräse S. Xanthenes from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. *Chem. Rev.* 2012; 112(7): 3717–76. <https://doi.org/10.1021/cr100446h>
- Chernov N.M., Shutov R.V., Sharoyko V.V., Kuz'mich N.N., Belyakov A.V., Yakovlev I.P. Synthetic route to 4,4a- and 3,4-dihydroxanthone through [4+2] cycloaddition and base-assisted sigmatropic rearrangement. *Eur. J. Org. Chem.* 2017; (19): 2836–41. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700310>
- Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П. Перспективы создания новых производных ксантона в качестве противомикробных средств. В кн.: *Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации»*. СПб.; 2018: 420–3.
- Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П. Взаимосвязь между строением новых производных дигидроксантона и их противомикробной активностью. В кн.: Щастной А.Т., ред. *Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»*. Витебск; 2019: 30–3.
- Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П. 4,4а-Дигидроксантоны как перспективные соединения для создания новых антимикробных препаратов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64(11-12): 3–7. <https://doi.org/10.1016/0235-2990-2019-64-11-12-3-7>
- Maillard J.Y. Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92(Suppl.): 16–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
- Li N., Tan S., Cui J., Guo N., Wang W., Zu Y.G., et al. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid, inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2014; 67(10): 689–96. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.49>
- Ko S.J., Kim M.K., Bang J.K., Seo C.H., Luchian T., Park Y. Macropis fulvipes venom component macropin exerts its antibacterial and anti-biofilm properties by damaging the plasma membranes of drug resistant bacteria. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16580. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16784-6>
- Halder S., Yadav K. K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Halder S., et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*. 2015; 4: 672. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>
- МЗ РФ. *Государственная фармакопея Российской Федерации: Том I*. М.; 2018: 1167–8.
- Lyapunova A.G., Danilkina N.A., Rumyantsev A.M., Khlebnikov A.F., Chislov M.V., Starova G.L., et al. Relative reactivity of benzothioephene-fused enediyne in the Bergman cyclization. *J. Org. Chem.* 2018; 83(5): 2788–801. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b03258>
- Прозоровский В.Б., Прозоровский М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология*. 1978; 41(4): 407–509.
- Hodge H.C., Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1949; 10(4): 93–6. <https://doi.org/10.1080/00968204909344159>
- Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. В кн.: Саноцкий И.В., ред. *Токсикология новых промышленных химических веществ: сборник статей. Выпуск 13*. М.: Медицина; 1973: 47–51.
- Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(3): 32–4.
- Koh J.J., Qiu S., Zou H., Lakshminarayanan R., Li J., Zhou X., et al. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828(2): 834–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.09.004>
- Zou H., Koh J.J., Li J., Qiu S., Aung T.T., Lin H., et al. Design and synthesis of amphiphilic xanthone-based, membrane-targeting antimicrobials with improved membrane selectivity.

- J. Med. Chem.* 2013; 56(6): 2359–73.
<https://doi.org/10.1021/jm301683j>
19. Koh J.J., Zou H., Mukherjee D., Lin S., Lim F., Tan J.K., et al. Amphiphilic xanthenes as a potent chemical entity of antimycobacterial agents with membrane-targeting properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 123: 684–703.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.068>
20. Koh J.J., Zou H., Lin S., Lin H., Soh R.T., Lim F.H., et al. Nonpeptidic amphiphilic xanthone derivatives: structure–activity relationship and membrane-targeting properties. *J. Med. Chem.* 2016; 59(1): 171–93.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01500>
21. Lin S., Koh J.J., Aung T.T., Lim F., Li J., Zou H., et al. Symmetrically substituted xanthone amphiphiles combat gram-positive bacterial resistance with enhanced membrane selectivity. *J. Med. Chem.* 2017; 60(4): 1362–78.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01403>
22. Зелди М.И. *Характеристика новых четвертичных соединений пиридинового ряда как перспективных антибактериальных агентов*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Казань; 2019.
23. Зверьков А.В., Зузова А.П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15(4): 279–85.
24. Литусов Н.В. *Грамположительные аэробные кокки. Иллюстрированное учебное пособие*. Екатеринбург; 2016.
7. Maillard J.Y. Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92(Suppl.): 16–27.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
8. Li N., Tan S., Cui J., Guo N., Wang W., Zu Y.G., et al. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid, inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2014; 67(10): 689–96.
<https://doi.org/10.1038/ja.2014.49>
9. Ko S.J., Kim M.K., Bang J.K., Seo C.H., Luchian T., Park Y. Macropis fulvipes venom component macropin exerts its antibacterial and anti-biofilm properties by damaging the plasma membranes of drug resistant bacteria. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16580.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16784-6>
10. Halder S., Yadav K. K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Halder S., et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*. 2015; 4: 672.
<https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>
11. Ministry of Health of the Russian Federation. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation: Volume 1 [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii: Tom 1]*. Moscow; 2018: 1167–8. (in Russian)
12. Lyapunova A.G., Danilina N.A., Rummyantsev A.M., Khlebnikov A.F., Chislov M.V., Starova G.L., et al. Relative reactivity of benzothiophene-fused enediyne in the Bergman cyclization. *J. Org. Chem.* 2018; 83(5): 2788–801.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b03258>
13. Prozorovskiy V.B., Prozorovskiy M.P., Demchenko V.M. Express method for determining the average effective dose and its error. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1978; 41(4): 407–509. (in Russian)
14. Hodge H.C., Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1949; 10(4): 93–6.
<https://doi.org/10.1080/00968204909344159>
15. Sidorov K.K. Classification of toxicity of poisons in parenteral administration methods. In: Sanotskiy I.V., ed. *Toxicology of New Industrial Chemicals: A Collection of Articles. Issue 13 [Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veshchestv: sbornik statey. Vypusk 13]*. Moscow: Meditsina; 1973: 47–51. (in Russian)
16. Berezovskaya I.V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37(3): 139–41.
17. Koh J.J., Qiu S., Zou H., Lakshminarayanan R., Li J., Zhou X., et al. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828(2): 834–44.
<https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.09.004>
18. Zou H., Koh J.J., Li J., Qiu S., Aung T.T., Lin H., et al. Design and synthesis of amphiphilic xanthone-based, membrane-targeting antimicrobials with improved membrane selectivity. *J. Med. Chem.* 2013; 56(6): 2359–73.
<https://doi.org/10.1021/jm301683j>
19. Koh J.J., Zou H., Mukherjee D., Lin S., Lim F., Tan J.K., et al. Amphiphilic xanthenes as a potent chemical entity of antimycobacterial agents with membrane-targeting properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 123: 684–703.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.068>
20. Koh J.J., Zou H., Lin S., Lin H., Soh R.T., Lim F.H., et al. Nonpeptidic amphiphilic xanthone derivatives: structure–activity relationship and membrane-targeting properties. *J. Med. Chem.* 2016; 59(1): 171–93.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01500>
21. Lin S., Koh J.J., Aung T.T., Lim F., Li J., Zou H., et al. Symmetrically substituted xanthone amphiphiles combat gram-positive bacterial resistance with enhanced membrane selectivity. *J. Med. Chem.* 2017; 60(4): 1362–78.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01403>

REFERENCES

22. Zeldi M.I. *Characteristics of new Quaternary pyridine compounds as promising antibacterial agents*: Diss. Kazan'; 2019. (in Russian)
23. Zver'kov A.V., Zuzova A.P. Chlorhexidine: past, present, and future of the famous antiseptic agent. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2013; 15(4): 279–85. (in Russian)

24. Litusov N.V. *Gram-Positive Aerobic Cocci. Illustrated Tutorial [Grampolozhitel'nye aerobnye kokki. Illyustrirovannoe uchebnoe posobie]*. Ekaterinburg; 2016. (in Russian)

Информация об авторах

Фролова Валерия Владимировна[✉] — ассистент каф. фармацевтической химии СПГХФУ, Санкт-Петербург, Россия, zhilyaeva.valeriya@pharminnotech.com, <https://orcid.org/0000-0003-0463-883X>

Чернов Никита Максимович — к.х.н., с.н.с. каф. органической химии СПГХФУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1278-8109>

Ивкин Дмитрий Юрьевич — к.б.н., доцент каф. фармакологии и клинической фармакологии, директор Центра экспериментальной фармакологии СПГХФУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>

Румянцев Андрей Михайлович — к.б.н., м.н.с. каф. генетики и биотехнологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>

Гурина Светлана Владимировна — к.б.н., доцент каф. микробиологии СПГХФУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4072-405X>

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

Статья поступила в редакцию 03.04.2021;
принята к публикации 12.06.2021;
опубликована 30.10.2021

Information about the authors

Valeriya V. Frolova[✉] — assistant, Department of pharmaceutical chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, zhilyaeva.valeriya@pharminnotech.com, <https://orcid.org/0000-0003-0463-883X>

Nikita M. Chernov — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, Department of organic chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1278-8109>

Dmitry Yu. Ivkin — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of pharmacology and clinical pharmacology, Director, Center for experimental pharmacology, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>

Andrey M. Rumyantsev — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Department of genetics and biotechnology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>

Svetlana V. Gurina — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of microbiology, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4072-405X>

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

The article was submitted 03.04.2021;
accepted for publication 12.06.2021;
published 30.10.2021

ОБЗОРЫ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-160>



Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19

Кравцов А.Л.[✉], Бугоркова С.А.

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

Аннотация

Пандемия COVID-19 продолжается, нанося колоссальный ущерб населению и мировой экономике. По мере изучения COVID-19 появляются новые данные относительно риска тяжёлого течения коронавирусной инфекции у пациентов с дефицитом α_1 -антитрипсина (ААТ). ААТ — основной ингибитор и ключевой эндогенный регулятор активности сериновых лейкоцитарных протеиназ, высвобождаемых из гранул активированных нейтрофилов на поверхность клеток и во внеклеточное пространство. Установлено, что число случаев тяжёлого течения и летального исхода COVID-19 на территориях 68 стран мира коррелирует с частотой распространения среди населения этих стран мутации в гене протеиназного ингибитора, при которой концентрация ААТ в плазме крови человека в 10 раз ниже нормы. Всё это способствует пересмотру ряда положений патогенеза и терапии COVID-19.

В обзоре представлен анализ литературы о роли ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19. Рассмотрено участие ААТ в ингибировании процесса проникновения SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки дыхательных путей, в защите эндотелия сосудов, белков плазмы крови и эластина лёгочной ткани от повреждающего действия лейкоцитарной эластазы, высвобождаемой при дегрануляции нейтрофилов и формировании нейтрофильных внеклеточных ловушек. Показана роль ААТ в супрессии воспаления посредством ограничения секреции в кровь провоспалительных цитокинов и нейтрофильных внеклеточных ловушек. Детализированы отдельные звенья патогенеза новой коронавирусной инфекции, что позволит пересмотреть стратегию снижения рисков тяжёлого течения COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, α_1 -антитрипсин, нейтрофильные внеклеточные ловушки, лейкоцитарная эластаза

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: Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021;98(5):567–578.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-160>

Review article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-160>

The role of plasma serine leukocyte proteinase inhibitor in the body's defense against COVID-19

Aleksandr L. Kravtsov[✉], Svetlana A. Bugorkova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Abstract

The COVID-19 pandemic continues, causing colossal damage to the population and the global economy. As COVID-19 is studied, new data are emerging regarding the risk of severe coronavirus infection in patients

with α_1 -antitrypsin deficiency. α_1 -Antitrypsin is the main inhibitor and key endogenous regulator of the serine leukocyte proteinase activity released from the granules of activated neutrophils to the cell surface and into the extracellular space. It has been established that the number of cases of severe course and death of COVID-19 in the territories of 68 countries of the world correlates with the frequency of the spread of mutations in the proteinase inhibitor gene among the population of these countries, at which the concentration of α_1 -antitrypsin in the human blood plasma is 10 times lower than normal. All this contributes to the revision of a number of provisions of the pathogenesis and therapy of a new coronavirus infection.

The review presents an analysis of the literature on the role of an inhibitor of serine leukocyte proteinases in protecting the body from COVID-19. The participation of α_1 -antitrypsin in the inhibition of SARS-CoV-2 penetration into the respiratory tract epithelial cells, in the protection of the vascular endothelium, blood plasma proteins and elastin of the lung tissue from the damaging effect of leukocyte elastase released during neutrophil degranulation and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) is considered. The role of α_1 -antitrypsin in suppressing inflammation by limiting the secretion of proinflammatory cytokines and neutrophil extracellular traps into the blood has been shown. The individual links in the pathogenesis of the new coronavirus infection have been detailed, which will allow revising the strategy for reducing the risks of severe course of COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, α_1 -antitrypsin, neutrophil extracellular traps, leukocyte elastase

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: Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. The role of plasma serine leukocyte proteinase inhibitor in the body's defense against COVID-19. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):567–578. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-160>

Введение

COVID-19 (COronaVirus Disease 2019) — это потенциально тяжёлая, острая респираторная инфекция, вызываемая новым коронавирусом (SARS-CoV-2) из группы бета-коронавирусов. Быстро распространяясь по территориям различных стран, этот вирус способен вызывать у некоторых пациентов серьёзное заболевание с развитием тяжёлого острого респираторного синдрома, диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдрома) и полиорганной недостаточности [1, 2].

Развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) приводит к выраженному нарушению дыхательной функции [3]. Смертность среди пациентов с ОРДС, нуждающихся в проведении искусственной вентиляции лёгких, составляет 20–50% [1, 4].

Продолжающийся рост числа погибших пациентов на фоне увеличения общего количества лиц, заражённых SARS-CoV-2, заставляет учёных, специалистов медицинских организаций и фармацевтических компаний активизировать исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов патогенеза этой опасной инфекции, на поиск эффективных средств терапии и профилактики COVID-19, способных существенно снизить показатель смертности [5, 6].

Влияет ли концентрация альфа-1-антитрипсина в плазме крови человека на тяжесть течения инфекции, обусловленной вирусом SARS-CoV-2?

В патогенезе COVID-19 выделяют 3 стадии развития болезни [4], каждая из которых соответ-

ствует этапам распространения вируса SARS-CoV-2 по респираторному тракту:

1) бессимптомное состояние (от 1 до 2 дней), когда вирус связывается с рецепторным аппаратом эпителиальных клеток интраназальной области, проникает в них и начинает репликацию;

2) стадия манифестации заболевания, когда в верхних дыхательных путях развивается острая защитная воспалительная реакция, предотвращающая либо не предотвращающая дальнейшее размножение вируса и его миграцию в течение нескольких следующих дней вниз по проводящим дыхательным путям к лёгким;

3) альвеолярная фаза с наиболее выраженными клиническими проявлениями, когда вирус поражает альвеоциты II типа и эндотелиоциты, а также запускает массивный апоптоз этих клеток на фоне гиперсекреции активированными нейтрофилами в кровь и межальвеолярное пространство нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ).

Важно, что до альвеолярной фазы заболевание прогрессирует только у 19–20% лиц, заражённых SARS-CoV-2 [1, 4]. И даже в этом случае у 14% пациентов болезнь протекает при сравнительно слабом повреждении эндотелия и умеренном нарушении дыхательной функции (среднетяжёлое течение) [4]. Лишь у 5% пациентов эта фаза может завершиться альвеолярным коллапсом с интенсивными эндотелиальными повреждениями, отёком лёгких и развитием характерного для ОРДС обширного разрушения лёгочной ткани (тяжёлое течение) [2–4]. Грубые нарушения гемостаза регистрируются у 100% пациентов с тяжёлым течением COVID-19. Через повреждённые участки эндотелия SARS-CoV-2 проникает в кровотоки, вызывая развитие вирусемии и септического

шока, что даже на фоне лечения в 20–50% случаев приводит к смерти больного [1].

Сопоставление этих данных с относительным количеством жителей Европейского континента и США, имеющих мутации в гене протеиназного ингибитора, контролирующего продукцию в организме α_1 -антитрипсина (ААТ), выявило интересную закономерность. Доля тяжёлых и среднетяжёлых случаев течения COVID-19, связанных с альвеолярной фазой развития болезни (19–20%), практически совпадала с долей лиц, имеющих сниженную концентрацию ААТ в плазме в результате 5 наиболее часто встречающихся генетических мутаций (15–17%) [7]. Самой неблагоприятной признана мутация гена протеиназного ингибитора в аллели Z, для которой характерно максимальное (до 10–15% от нормы) снижение концентрации ААТ в периферической крови. Именно эта врождённая патология обычно имеется в виду, когда исследователи используют в своих публикациях термин «дефицит ААТ» [7, 8]. И здесь снова интересная закономерность: доля носителей этой мутации в Европе и США достигает 4–5% и частота критических вариантов развития COVID-19 в этих странах, по данным статистики, — порядка 5%.

ААТ — белок, который вырабатывается печенью и участвует в инактивации ферментов, при этом основная его функция состоит в защите лёгких от эластазы, высвобождаемой из гранул нейтрофилов в ответ на внедрение инфекционного агента и являющейся биохимическим маркёром воспалительного процесса. Если активность эластазы не контролируется ААТ, она начинает разрушать ткани лёгких.

Дефицит ААТ неизбежно ведёт к развитию эмфиземы — как первично, так и на фоне хронического бронхита, хронической обструктивной болезни лёгких или любого другого неспецифического хронического лёгочного заболевания [9, 10]. Кроме того, на фоне дефицита ААТ развиваются системные васкулиты, диабет 1-го типа, ревматоидный артрит и другие аутоиммунные воспалительные болезни [7]. Именно пациенты с хронической обструктивной болезнью лёгких, эмфиземой и аутоиммунными заболеваниями относятся к группе риска по развитию тяжёлого течения COVID-19 [2].

Эпидемиологические исследования Н. Yoshikura показали, что существует сильная прямая корреляционная связь между распространённостью дефицита ААТ на территориях 68 стран мира и эпидемической ситуацией по COVID-19: как по числу инфекционных осложнений ($r = 0,8584$; $p < 0,05$), так и по количеству смертельных исходов ($r = 0,8713$; $p < 0,05$) [11]. Отмечено, что в странах с высокой распространённостью дефицита ААТ (Европа и США) высокий показатель смертности от COVID-19 сохранялся на протяжении более 6 мес и не зависел от изменения ситуации по заболеваемо-

сти, в то время как в странах с низкой распространённостью дефицита ААТ (Япония, Китай и другие страны Азии) после первой волны эпидемии количество смертей постоянно снижалось, при этом общее число пациентов оставалось таким же или даже увеличивалось [11].

α_1 -Протеиназный ингибитор, приготовленный из плазмы крови человека [12], на протяжении десятилетий применяется в качестве заместительной терапии дефицита ААТ при профилактике эмфиземы и других хронических воспалительных заболеваний, связанных с разрушением соединительной ткани [7]. При его внутривенном введении стабилизируются параметры гемодинамики и коагуляции при септическом шоке и ДВС-синдроме [13]. Поскольку в настоящее время этот препарат рассматривают в качестве перспективного средства экстренной профилактики и лечения COVID-19 [6, 12, 14], важное значение приобретают накопление и анализ имеющейся информации о физиологической функции, выполняемой плазменным ААТ в организме человека. При дальнейшем изложении материала, опираясь на схему, представленную на **рисунке**, мы постараемся рассмотреть роль ААТ с позиции реализации возможных патофизиологических механизмов инактивации повреждающего действия SARS-CoV-2 на клетки макроорганизма.

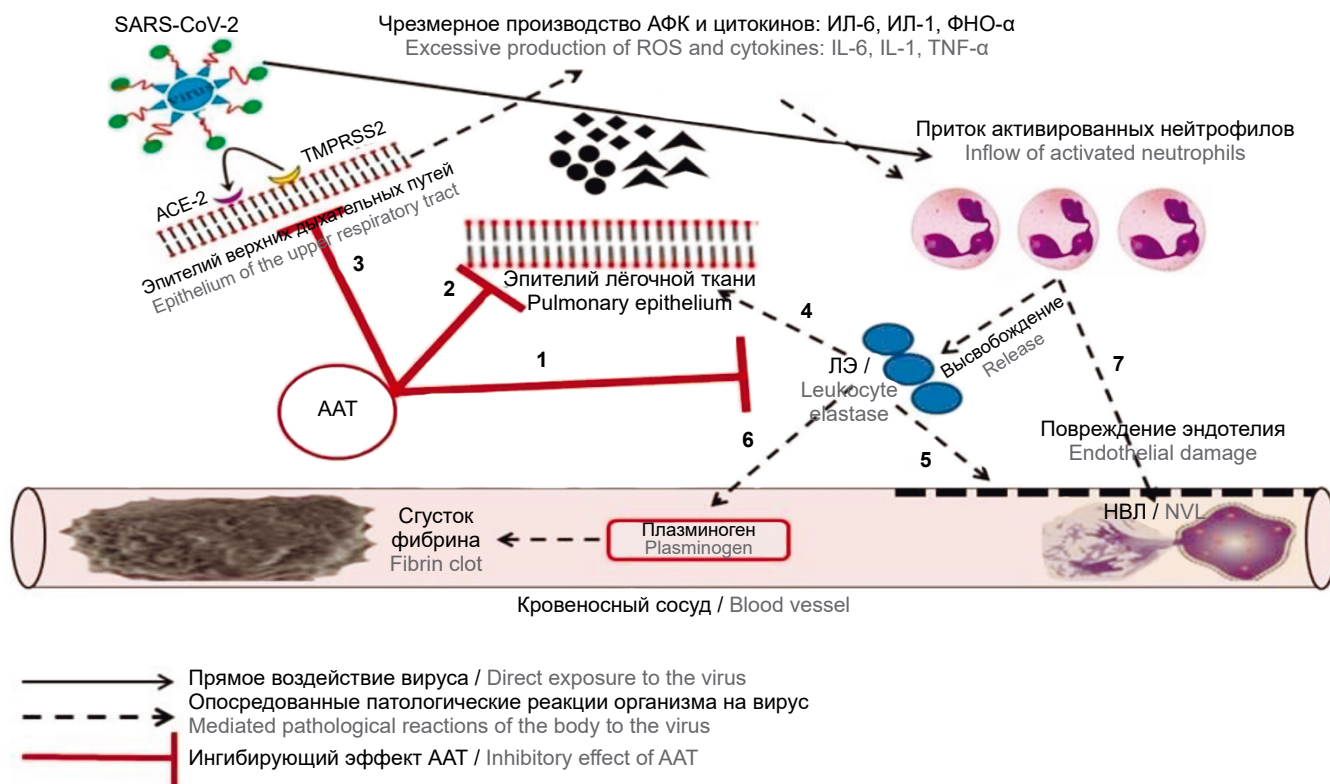
Роль α_1 -антитрипсина в защите клеток и тканей организма от разрушительного действия лейкоцитарной эластазы

Плазма крови содержит 7 белковых ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов), составляющих около 10% всех присутствующих в ней белков [10].

К ним относятся:

- SERPINA1 (ААТ, часто называемый α_1 -протеинасным ингибитором), который защищает лёгочную ткань от лейкоцитарной эластазы (ЛЭ);
- SERPINA5 (ингибитор С белка);
- SERPINC1 (антитромбин), контролирующий протеазы коагуляции;
- SERPIND (гепариновый кофактор II);
- SERPINE1 (ингибитор активатора плазминогена);
- SERPING1 (ингибитор С1), регулирующий комплемент, калликреин и активацию контактной фазы;
- SERPINF2 (α_2 -антиплазмин), который ингибирует плазмин и регулирует фибринолиз.

Баланс между сериновыми протеазами плазмы крови и их серпинами, обеспечивающий нормальное функционирование биологических систем здорового организма, грубо нарушается при COVID-19 в 4 основных протеолитических каскадах (коагуляции, комплемента, фибринолиза и калликреина) под влиянием ЛЭ, в большом количестве высво-



Примерная схема противодействия SARS-CoV-2 посредством ААТ.

- 1 — нейтрализация внеклеточной протеолитической активности лейкоцитарной эластазы, предотвращающая повреждение легочного эпителия (4), эндотелия сосудов (5), разрушение плазминогена (6) и чрезмерное формирование НВЛ (7);
- 2 — эндогенная супрессия гиперпродукции клетками активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных цитокинов, препятствующая генерализации воспалительной реакции;
- 3 — подавление процесса проникновения коронавируса в эпителиальные клетки, обусловленное ингибированием активности сериновых протеиназ (трансмембранной сериновой протеазы 2-го типа — transmembrane protease serine 2 — TMPRSS-2 и др.), расщепляющих S-белок SARS-CoV-2 на субъединицы.

An exemplary scheme for countering SARS-CoV-2 by means of AAT.

- 1 — neutralization of the extracellular proteolytic activity of leukocyte elastase, preventing damage to the pulmonary epithelium (4), vascular endothelium (5), destruction of plasminogen (6) and excessive formation of NVL (7);
- 2 — endogenous suppression of overproduction of ROS and pro-inflammatory cytokines by cells, preventing the generalization of the inflammatory response;
- 3 — suppression of the process of penetration of coronavirus into epithelial cells due to inhibition of the activity of serine proteases (type 2 transmembrane protease serine 2 — TMPRSS-2, etc.), which cleave the SARS-CoV-2 S-protein into subunits.

бождаемой из гранул активированных нейтрофилов при массивной дегрануляции и нетозе этих клеток в ткани лёгких, печени и других органов. В результате при COVID-19 в организме развивается «протеолитический шторм» и связанный с ним «цитокиновый шторм» на фоне формирующейся гиперактивности коагуляционного каскада, эндотелиопатии и гипоксии, что ведёт к интенсивному разрушению эластина лёгочной ткани и к тромботическим осложнениям в сосудах различных органов [4]. По данным недавно проведённых клинических исследований, дисбаланс в системе эластаза–ААТ имеет место в организме всех пациентов с тяжёлой формой COVID-19, особенно в период, предшествующий гибели организма от новой коронавирусной инфекции [15].

Уровень активности ЛЭ в мазках из носоглотки пациентов с диагнозом COVID-19 в 3 раза выше

нормы [16], а в крови и бронхоальвеолярном лавже пациентов с сепсисом и ОРДС отмечается десятикратное увеличение значений данного показателя [17, 18]. Обладая самой широкой субстратной специфичностью, эта сериновая протеаза при дисбалансе в системе фермент–ингибитор (эластаза–ААТ) гидролизует не только различные структурные белки, включая эластин, но и множество белков плазмы крови: факторы гемокоагуляции, фибринолиза, калликреин-кининовой системы и компонента, в том числе все перечисленные выше серпины [9, 10]. Установлена ключевая роль ЛЭ в разрушении лёгочной ткани при хронической обструктивной болезни лёгких, эмфиземе, других лёгочных заболеваниях и ОРДС [19] и, соответственно, роль ААТ в предотвращении этих повреждений [7]. Способность инактивировать практически все регуляторные компоненты протеолитических систем,

ответственных за процессы адаптации и защиты, определяет решающую роль ЛЭ в нарушении регуляции процессов свертывания крови при туберкулезе [20], раке лёгких [21] и, видимо, при COVID-19 [2, 4, 5, 15].

Грубое нарушение гемостаза при тяжёлой форме COVID-19 проявляется в резком снижении содержания в крови антитромбина III и протеазы ADAMTS13 на фоне «протеолитического шторма» и «цитокинового шторма» [4], разрушении эластазой плазминогена без образования функционально активного плазмина [2, 5], повышении концентрации D-димера и продуктов деградации фибриногена [1, 15], а также в появлении в периферической крови пациентов НВЛ в количестве более 16% [22]. Считается, что у пациентов с острой септициемией изменение уровня факторов свертывания и возрастание количества фрагментов деградации фибриногена является результатом прямого протеолитического расщепления белков плазмы крови сериновыми лейкоцитарными протеазами (СЛП) [18, 20, 23].

Среди присутствующих в крови серпинов ААТ имеет наибольшую концентрацию (норма от 1,2 до 2 мг/мл) и обеспечивает около 80% общего антипротеолитического потенциала плазмы крови [10]. Этот белок, продуцируемый гепатоцитами и в меньшей степени лёгочными эпителиальными клетками [8], является ингибитором трех СЛП: эластазы, катепсина G и протеазы 3, но считается ингибитором в основном ЛЭ, поскольку в зрелых нейтрофилах крови человека только эластаза присутствует в огромной концентрации (5,33 мМ или около 67 000 молекул на одну гранулу) [24] и является наиболее изученной СЛП, на долю которой в первичных гранулах этих клеток приходится не менее 90% суммарной протеолитической активности [9]. Кроме ААТ, ЛЭ может связываться в плазме крови только с α_2 -макроглобулином, который подавляет её активность с меньшей эффективностью. Другие плазменные серпины в отношении ЛЭ не активны [10].

При стимуляции нейтрофилов хемоаттрактантами СЛП в строго определённом количестве высвобождаются из гранул на клеточную поверхность, где функционируют, проявляя свою каталитическую активность, в присутствии ААТ за счёт подавления процесса образования связей фермент-ингибитор АФК, продуцируемые клеткой при «окислительном взрыве» [25, 26]. В сравнении с низкой поверхностной экспрессией СЛП на неактивированных клетках хемоаттрактанты (fMLP и C5a) повышают её в 3 раза, но на фоне предварительного праймирования нейтрофилов липополисахаридами (ЛПС) стимулирующий эффект хемоаттрактантов даёт различия в уровне экспрессии СЛП уже не в 3, а в 10 раз. Повышение уровня поверхностной экспрессии протеаз в 30 раз вызывает активатор функции нейтрофилов форбол-12-миристат-13-ацетат

[25], который является классическим и наиболее часто используемым на практике индуктором нетоза [27, 28].

В точке контакта активированного нейтрофила с эндотелием ААТ и АФК регулируют каталитическую активность поверхностной ЛЭ в пространстве и времени, ограничивая протеолитическое действие фермента расстоянием не более 1,33 мкм от клетки и длительностью не более 12,4 мс [24]. В условиях нормальной регуляции, когда нет дефицита ААТ и/или отсутствует чрезмерная дегрануляция нейтрофилов, обеспечивается умеренное и достаточно быстрое расщепление эластазой кадгерина, ответственного за плотное соединение эндотелиальных клеток, что формирует в эндотелии «щель» оптимального размера для выхода нейтрофилов из сосудистого русла [29]. При дефиците ААТ регуляция процесса нарушается, приводя к эндотелиальному повреждению, т.к. в данном случае в 2,5 раза увеличивается расстояние, на которое распространяется протеолитический эффект поверхностной ЛЭ, и, главное, в 6 раз увеличивается промежуток времени, в течение которого ЛЭ оказывает на эндотелий своё повреждающее воздействие [24].

Расщепляя белковую часть гепарансульфат-протеогликана, входящего в состав образуемого эндотелиальными клетками внеклеточного матрикса, ЛЭ в большом количестве высвобождает из него растворимый гепарансульфат, который является эндогенным лигандом Toll-подобного рецептора 4 класса (TLR4) различных клеток и, как следствие, запускает в организме эндогенный путь развития синдрома системного воспалительного ответа [30]. Поверхностная протеаза-3, действуя совместно с ЛЭ, усиливает нейтрофильное воспаление путём деградации предшественника гранулина-эпителина (програнулина), выполняющего в организме функцию супрессора развития воспалительного процесса [31], а катепсин G преобразует на поверхности активированных нейтрофилов ангиотензин I в ангиотензин II, выполняя функцию ангиотензинпревращающего фермента, что является важным дополнительным фактором повышения проницаемости сосудов и нарушения регуляции артериального давления [32].

Причину тяжёлых осложнений при COVID-19 в настоящее время объясняют чрезмерной воспалительной реакцией на SARS-CoV-2 [1, 3, 5, 22], очень интенсивной секреторной азурофильной дегрануляцией нейтрофилов [16], индуцируемой вирусом на фоне как количественного, так и функционального дефицита ААТ [2, 11]. Частично утрачивать свои функциональные свойства ААТ может под влиянием протеолитических ферментов [9], табачного дыма [33], при интенсивном окислении в условиях окислительного стресса [2], а также при адсорбции большого количества ЛЭ на нитях молекулы ДНК,

образующих каркас ДНК-сетей НВЛ [23]. Значительное увеличение продукции АФК сопровождается все респираторные вирусные инфекции, в том числе COVID-19 [34]. При окислительном стрессе окисляется большое количество присутствующих в лизосомах ионов железа, что нарушает стабильность лизомальных мембран [35]. Чрезмерная дегрануляция нейтрофилов приводит к массивной их гибели и неизбежному аутолизису этих клеток (некрозу или вторичному некрозу) с высвобождением большого количества молекул СЛП во внеклеточное пространство [27, 36]. В этих условиях ещё больше возрастает роль ААТ в защите клеток и тканей организма от разрушительного действия ЛЭ.

Действие α_1 -антитрипсина как эндогенного супрессора воспаления и регулятора формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек

В свете современных представлений высвобождаемые при дегрануляции нейтрофилов СЛП рассматриваются как сигнальные молекулы, контролируемые, подобно гормонам, функцию различных клеток, вовлекаемых в развитие воспаления и в процесс коагуляции. Сигнальный путь реализуется путём протеолитической модуляции экспрессии и активности рецепторов на клеточной поверхности, а также посредством регуляции синтеза и секреции клетками цитокинов [37, 38]. Тромбоциты, лимфоциты, макрофаги, эндотелиальные и эпителиальные клетки экспрессируют на своей поверхности специальные протеолитически активируемые рецепторы (protease-activated receptors — PARs), которые выполняют функцию сенсоров протеаз при воспалении и иммунном ответе. Связываясь с рецептором семейства PARs, протеаза отщепляет от него N-концевой пептид, что открывает привязанный лиганд (пептид, агонист протеазы). Лиганд активирует рецептор, запуская каскад сигнальных реакций, приводящих к быстрой транскрипции генов, ответственных за стимуляцию продукции цитокинов и регулирующих клеточную гибель в очаге воспаления [39, 40].

Через PAR1 и PAR2 на эпителиальных клетках поверхностные СЛП активированных нейтрофилов регулируют секреторную функцию эпителия и лейкоцитарную трансэпителиальную миграцию [37]. Активируя эпителиальные клетки и расщепляя связывающих их кадгерин, ЛЭ индуцирует апоптоз эпителиоцитов [41]. Причём данные T. Suzuki и соавт. свидетельствуют о том, что в этом случае апоптоз запускается по пути, который контролируется протеолитической активацией PAR1 на поверхности клеток лёгочного эпителия — PAR-1–NF- κ B–p53 [42]. Катепсин G активирует через PAR4 секреторную функцию тромбоцитов, регулируя таким обра-

зом их взаимодействие с нейтрофилами и другими клетками в очаге воспаления. Через PAR2 все три СЛП регулируют секрецию цитокинов и хемокинов Т-лимфоцитами-хелперами и другими лейкоцитами [37, 39]. По экспериментальным данным, мышинные лимфоциты, утратив экспрессию PAR2 в результате генетической мутации, продуцируют в ответ на антигенную стимуляцию значительно меньше интерферона- γ и интерлейкина-17 (ИЛ-17) [43]. Экспрессия PARs на поверхности нейтрофилов приводит к активации этих рецепторов поверхностными СЛП и, как следствие, к повышенной продукции в кровь провоспалительных цитокинов нейтрофильными гранулоцитами, стимулированными ЛПС, форбол-12-мири-стат-13-ацетатом или хемоаттрактантами [39].

ААТ, регулирующий активность СЛП плазмы крови человека, является мощным эндогенным супрессором воспаления, ограничивающим продукцию АФК [44] и секрецию в кровь провоспалительных цитокинов. При антигенной стимуляции лейкоцитов в образцах цельной крови лиц с врождённым дефицитом ААТ клетки продуцируют ИЛ-6 и ИЛ-1 соответственно в 3,4 и 8,4 раза больше, чем лейкоциты крови доноров, не имеющих такой патологии. Гиперсекрецию цитокинов в плазму крови лиц с дефицитом ААТ подавлял предварительно выделенный из крови белок ААТ, если он добавлялся в кровь перед антигенной стимуляцией в нормальной физиологической концентрации, и это обеспечивало эффективность супрессии по ИЛ-6, фактору некроза опухоли- α (ФНО- α) и ИЛ-1 — 97, 91 и 47% соответственно. Спонтанную продукцию ИЛ-1, -6 и ФНО- α отдельными лейкоцитами можно было активировать путём разведения крови средой RPMI, т.к. разведение снижало концентрацию α_1 -протеиназного ингибитора (белка ААТ) в плазме [8].

«Цитокиновому шторму» и «протеолитическому шторму» в организме пациентов с тяжёлой формой COVID-19 сопутствует массивная продукция активированными клетками НВЛ [1, 2, 4, 22]. Нетоз — это АФК-зависимый процесс, который представляет собой генетически детерминированную запрограммированную гибель нейтрофилов и связан с последовательными необратимыми морфологическими изменениями в клетках: деконденсацией хроматина; фрагментацией ядерных и лизосомальных мембран; смешиванием ядерных структур с содержимым цитоплазмы и нарушением целостности цитоплазматической мембраны; высвобождением во внеклеточное пространство нитей молекулы ДНК (ДНК-сетей), декорированных гистонами, большим количеством молекул ЛЭ, а также двух других СЛП и различных бактерицидных катионных белков цитоплазматических гранул [2, 27].

Способность вирусов индуцировать нетоз прямым воздействием на нейтрофильные гранулоциты признана сравнительно недавно, и молекулярные

механизмы формирования НВЛ в контексте вирусной инфекции мало изучены. В запуске этого процесса могут участвовать эндосомные TLR7 и TLR8, как в случае с ВИЧ-1, или β_2 -интегрины, как в случае с хантавирусами [45], но пока нет данных о том, что SARS-CoV-2 проникает в нейтрофилы или в большом количестве адсорбируется на клеточной поверхности, чтобы запустить в этих клетках процесс интенсивной азурофильной дегрануляции. Тем не менее результаты патологоанатомических работ подтверждают факт обширной инфильтрации лёгочной ткани умерших от COVID-19 пациентов нейтрофилами, формирующими НВЛ [2, 3], а высокое содержание НВЛ в мазках периферической крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе (более 16%), предложено использовать как критерий негативного прогноза течения COVID-19 и риска летального исхода заболевания [22]. Гиперсекреция НВЛ в условиях новой вирусной инфекции способствует развитию альвеолита, повреждению эндотелия, активации тромбоцитов и множества других процессов, которые в итоге запускают внутрисосудистое свертывание крови [1]. Центральную роль в механизме развития тяжёлой фибринолитической недостаточности может играть адсорбция большого количества молекул ЛЭ в ДНК-сетях НВЛ [2], сильно нарушающая эффективность ингибирования этой СЛП ее плазменным ингибитором ААТ [23].

Деконденсацию ядерного хроматина при формировании ДНК-сетей НВЛ запускает ЛЭ, которая в случае чрезмерной дегрануляции нейтрофилов попадает в клеточные ядра, где расщепляет ядерные гистоны, ответственные за поддержание хроматина неактивированных клеток в плотном конденсированном состоянии. Фактически нетоз регулируется эластазой, а также миелопероксидазой, усиливающей эффект ЛЭ [27]. В условиях *in vivo* ключевую роль ЛЭ в запуске нетоза доказывает способность препарата специфического низкомолекулярного ингибитора ЛЭ (сивелестат) предотвращать формирование НВЛ и спасать животных при эндотоксическом шоке, индуцируемом летальными дозами ЛПС грамотрицательных бактерий. Этот препарат, разработанный в Японии и Южной Корее для лечения пациентов с ОРДС, вводился в организм лабораторных животных с использованием особых наночастиц, пролонгирующих его защитное действие [46].

К накоплению НВЛ в крови и различных органах приводит дисбаланс между нетозом и процессом удаления ДНК-сетей из организма, контролируемым ДНКазой I [3]. Такой дисбаланс может быть связан с недостаточной активностью нуклеазы (например, при атеросклерозе) [32], а возможную причину снижения активности ДНКазы I объясняют существенным изменением структурных и адгезивных свойств ДНК-сетей НВЛ, формируемых в условиях дефицита ААТ [28]. Несбалансированное

формирование НВЛ зарегистрировано в настоящее время при всех известных аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваниях, связанных с неконтролируемым разрушением соединительной ткани. Поскольку лица, имеющие эти заболевания, относятся к группе риска по тяжёлому течению COVID-19 [2], а сами эти болезни протекают на фоне врождённого (и/или приобретённого) дефицита ААТ [7], то контролирующей активность ЛЭ плазменный ингибитор СЛП (белок ААТ) играет, вероятно, решающую роль как фактор, ограничивающий формирование ДНК-сетей НВЛ и их накопление при COVID-19 в лёгких и периферической крови больных [6].

α_1 -Антитрипсин препятствует проникновению SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки

Получать доступ к эпителиальным клеткам-мишеням всем коронавирусам, способным вызвать у людей смертельное заболевание (SARS-CoV, MERS-CoV, и SARS-CoV-2), позволяет вирусный S-белок, который связывается с поверхностным рецептором ангиотензинпревращающего фермента-2 либо с коллагеновым рецептором дипептидилпептидазой IV (CD26) в случае инфицирования MERS-CoV. Для ускорения процесса проникновения коронавирусов в клетки-мишени требуется протеолитическое расщепление S-протеина на две субъединицы (S1 и S2) TMPRSS-2, экспрессируемой на поверхности эпителиоцитов респираторного и пищеварительного трактов, верхние отделы которых являются входными воротами инфекции [34, 47].

Из объединённого 20-литрового объёма жидкости бронхоальвеолярного лаважа, полученного от серонегативных по SARS-CoV-2 здоровых доноров, L. Wettstein и соавт. выделили фракции различных белков с целью определения их способности ингибировать проникновение SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки [12]. Была установлена фракция, лучше всего подавляющая раннюю внутриклеточную стадию развития вирусной инфекции. В этой фракции был идентифицирован конкретный белок (серпин ААТ), ответственный за ингибирование процесса проникновения SARS-CoV-2 как в клетки лёгочного эпителия человека, так и в эпителиальные клетки линии Vero E6, экспрессирующие поверхностную TMPRSS-2. Специфичность ААТ при ингибировании проникновения SARS-CoV-2 была продемонстрирована его неспособностью подавлять вирусные псевдочастицы, несущие G-белок вируса везикулярного стоматита.

По данным K.Y. Oguntuyo и соавт., сыворотки крови индивидуумов, не имевших контакта с SARS-CoV-2, с высокой эффективностью ингибировали проникновение этого вируса в клетки эпителия и ответственным за это был ААТ, действие которого

могло быть связано с нейтрализацией протеолитической активности как TMPRSS-2, так и ЛЭ [14]. Хотя *in vitro* модулирующий эффект ЛЭ на процесс проникновения в клетки SARS-CoV-2 ещё экспериментально не подтверждён, этот эффект достаточно хорошо изучен при моделировании взаимодействия эпителиальных клеток с SARS-CoV (вирусом 2002 г.) [48] и может иметь важное значение как фактор, существенно ускоряющий распространение вируса в условиях *in vivo*, когда в очаг воспаления мигрирует большое количество активированных нейтрофилов и возникает дисбаланс в системе эластаза–ААТ. В присутствии активной эластазы, оказывающей повреждающее воздействие на эпителиальные клетки и их рецепторы [37, 42], в 100–1000 раз увеличивается скорость проникновения коронавируса в эпителиоциты и, как следствие, резко повышается интенсивность его внутриклеточного размножения [49]. Кроме TMPRSS-2 и эластазы, расщеплять S-белок, позволяющий коронавирусам получать доступ к клеткам-мишеням, могут и другие протеазы, изменяющие проницаемость клеточных мембран: трипсин, катепсин и TMPRSS-11a. Привлечение дополнительных протеаз для нарезания S-протеина, вероятно, расширяет спектр чувствительных к коронавирусам клеток-мишеней и может быть одним из важных факторов патогенности [47].

У лабораторных животных совместное интраназальное введение SARS-CoV с ЛПС грамотрицательных бактерий вызывало острую вирусную инфекцию с развитием тяжёлой формы пневмонии, в то время как в ответ на введение в верхние дыхательные пути той же дозы одного коронавируса острое вирусное заболевание не прогрессировало. В этих опытах ЛПС применяли в нетоксичных дозах, при которых он сам по себе не индуцировал в организме существенных патологических изменений. Авторы этих исследований объясняют феномен хорошо известной способностью ЛПС функционально активировать нейтрофилы с высвобождением на поверхность клеток ЛЭ и других СЛП, а также стимулирующим эффектом ЛЭ на процесс проникновения вируса в эпителиальные клетки верхних дыхательных путей. Иначе невозможно было бы объяснить, почему развитие тяжёлой формы лёгочной инфекции при совместном введении вируса и ЛПС подавляли специфические ингибиторы ЛЭ [50].

Обсуждение

Несмотря на почти 20-летнюю историю изучения коронавирусов, понимание патогенеза новой коронавирусной инфекции, обусловленной SARS-CoV-2, остаётся неполным, особенно в отношении механизма запуска каскада реакций в организме, приводящих к полиорганной дисфункции. Поиск эффективных методов профилактики и лечения этой потенциально опасной инфекции продолжается.

В условиях, когда подавляющая часть населения Земли против COVID-19 ещё не вакцинирована, необходимо продолжать исследование уже существующих противовирусных и противовоспалительных препаратов с приемлемым профилем безопасности в качестве средств, нацеленных на SARS-CoV-2 и на предотвращение запуска патофизиологических механизмов тяжёлого течения COVID-19.

Появление современной гипотезы о ключевой роли в патогенезе COVID-19 нетоза и нарушенной при нетозе регуляции активности ЛЭ ее ингибитором ААТ [2], тесно связано с изменившимися в новом тысячелетии представлениями о той роли, которую нейтрофильные гранулоциты играют в иммунопатогенезе широкого спектра различных заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии [51]. Нетоз как механизм формирования НВЛ был открыт в 2004 г., в период между вспышкой коронавирусной инфекции 2002 г. и нынешней пандемией SARS-CoV-2, что явилось мощным стимулом для проведения исследований, лежащих в основе данной гипотезы. Недавно начаты клинические испытания при COVID-19 препарата дорназа альфа (рекомбинантная человеческая дезоксирибонуклеаза-1, ДНКаза I) [3], а также специфических ингибиторов TMPRSS-2 (камостат) [52] и ЛЭ [5]. Специалисты прогнозируют повышенную эффективность стратегии одновременного использования нуклеазы и ингибиторов протеаз на фоне антиоксидантной терапии. В этом случае лечение будет направлено не только на клиренс сетей НВЛ, но и на предотвращение процесса формирования новых НВЛ в условиях *in vivo*.

Новая информация о молекулярных механизмах патогенеза COVID-19, в кратчайшие сроки полученная совместными усилиями учёных различных стран, представляет интерес для специалистов, занимающихся изучением вопросов патогенеза как вирусных, так и бактериальных особо опасных инфекционных болезней. Например, недостаточно изучен патогенез лёгочной формы чумы и туляремии, поскольку о способности устойчивых к фагоцитозу клеток *Yersinia pestis* и *Francisella tularensis* запускать гибель нейтрофилов организма хозяина с длительной задержкой по времени стало известно лишь в новом тысячелетии [53, 54]. Эта задержка приводит к массивному аутолизису нейтрофилов в периферической крови на 2–3-и сутки после аэрогенного заражения и к молниеносной генерализации воспалительного процесса с быстрым развитием в организме ДВС-синдрома, что объясняют высвобождением в плазму крови огромного количества молекул ЛЭ [36].

Заключение

Таким образом, анализ источников литературы показывает важную роль количественного и функционального дефицита плазменного ингибитора

СЛП — ААТ в патогенезе новой коронавирусной инфекции, вследствие чего представляется обоснованным применение медикаментозных средств, подавляющих активность TMPRSS-2 и ЛЭ, для профилактики и лечения COVID-19. Дальнейшие полномасштабные клинико-экспериментальные исследования в этом направлении позволят детализировать механизм патогенеза новой коронавирусной инфекции и будут способствовать разработке эффективных средств и методов борьбы с SARS-CoV-2.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Макацария А.Д., Слуханчук Е.В., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Цибилова В.И. и др. COVID-19, нарушения гемостаза и риск тромботических осложнений. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020; 75(4): 306–17. <https://doi.org/10.15690/vramn1368>
2. Thierry A., Roch V. Neutrophil extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>
3. Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Шмарина Г.А., Красовский С.А., Кудлай Д.А., Маркова О.А. и др. Дорназа альфа в лечении COVID-19: разрушение нейтрофильных внеклеточных ловушек. *Пульмонология*. 2020; 30(3): 344–9. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2020-30-3-344-349>
4. Fornasari P.M. COVID-19: Neutrophils «unfriendly fire» imbalance proteolytic cascades triggering clinical worsening and viral sepsis. Potential role explanation for convalescent plasma as «Firehose». *J. Blood Res. Hematol. Dis.* 2020; 5(2). [https://doi.org/10.37532/jbhrd.2020.5\(2\).120](https://doi.org/10.37532/jbhrd.2020.5(2).120)
5. Thierry A.R. Anti-protease treatments targeting plasmin(ogen) and neutrophil elastase maybe beneficial in fighting COVID-19. *Physiol. Rev.* 2020; 100(4): 1597–8. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2020>
6. Bai H., Hippensteel J., Leavitt A., Maloney J.P., Beckham D., Garcia C., et al. Hypothesis: alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med. Hypothesis*. 2021; 146: 110394. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110394>
7. De Serres F., Blanco I. Role alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J. Internal Medicine*. 2014; 276(4): 311–35. <https://doi.org/10.1111/joim.12239>
8. Pott G.B., Chan E.D., Dinarello C.A., Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J. Leukoc. Biology*. 2009; 85(5): 886–95. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208145>
9. Korkmaz B., Horvitz M.S., Jenne D.E., Ganthier F. Neutrophil elastase, protease 3 and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62(4): 726–59. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002733>
10. Яровая Г.А. Свойства и клинико-диагностическое значение определения эластазы из панкреатической железы и полиморфноядерных лейкоцитов. *Лабораторная медицина*. 2006; 8: 43–9.
11. Yoshikura H. Epidemiological correlation between COVID-19 and epidemical prevalence of α -1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2020; 3(2): 73–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01068>
12. Wettstein L., Weil T., Conzelmann C., Müller J.A., Groß R., Hirschenberger M., et al. Alpha-1-antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 2020; 12(1): 1726. DOI: 10.1038/s41467-021-21972-0
13. Jourdain M., Carrette O., Tournays A., Fourrier F., Mizon C., Mangalaboyi J., et al. Effects of inter- α -inhibitor in experimental endotoxic shock and disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156(6): 1825–33. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.6.9611100>
14. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Siddiquey M., Schilke R.M., Woodlard M.D., Zang H., et al. In plain sight: the role of alpha-1 antitrypsin in COVID-19 pathogenesis and therapeutics. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248880>
15. Zerimech F., Jourdain M., Ouraed B., Bouchecareilh M., Seudid B., Duhamel A., et al. Protease-antiprotease imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021; 59(8): e330–e334. <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0137>
16. Akgun E., Tuzuner M.B., Suhin B., Kilercik K.M., Kulah S., Cakiroglu H.V., et al. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0240012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240012>
17. Zheutlin L.M., Thonar E., Jacobs E.R., Hanley M.E., Balk R.A., Bone R.C. Plasma elastase levels in the adult respiratory distress syndrome. *J. Crit. Care*. 1986; 1(1): 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0883-9441\(86\)80115-0](https://doi.org/10.1016/S0883-9441(86)80115-0)
18. Madoiwa S., Tanaka H., Nagahama Y., Dokai M., Kashiwakura Y., Ishiwata A. Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* 2011; 127(4): 349–55. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.12.008>
19. Kawabata K., Hagio T., Matsuoka S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 451(1): 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02182-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02182-9)
20. Доценко В.Л., Спирина А.Я., Макинский А.И., Нешкова Е.А., Ёршикова Ю.Е., Яровая Г.А. Эластаза в плазме крови больных туберкулёзом и ее роль в нарушении регуляции процессов свертывания крови. *Вопросы медицинской химии*. 2000; 46(2): 176–83.
21. Gabazza E.C., Taguchi O., Yamakami T., Machishi M., Iyata H., Suzuki S. Correlation between increased granulocyte elastase release and activation of blood coagulation in patients with lung cancer. *Cancer*. 1993; 72(7): 2134–40. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19931001\)72:7%3C2134::aid-cnrcr2820720712%3E3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931001)72:7%3C2134::aid-cnrcr2820720712%3E3.0.co;2-8)
22. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19. *Альманах клинической медицины*. 2020; 48(S1): S43–50. <https://doi.org/10.18786/2072-05-05-2020-48-029>
23. Da Cruz D.B., Helms J., Aquino L.R., Steil L., Cougordan L., Broussard C., et al. DNA-bound elastase of neutrophil extracellular traps degrades plasminogen, reduces plasmin formation, and decreases fibrinolysis: proof of concept in septic shock plasma. *FASEB J.* 2019; 33(12): 14270–80. <https://doi.org/10.1096/fj.201901363RRR>
24. Liou T.G., Campbell E.J. Non-isotropic enzyme-inhibitor interactions: a novel non-oxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry*. 1995; 34(49): 16171–7. <https://doi.org/10.1021/bi.0049a032>
25. Owen C.A., Campbell M.A., Sunnes P.L., Boukedes S.S., Campbell E.J. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteases. *J. Cell Biol.* 1995; 131(3): 775–89. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.775>
26. Weitz J.L., Huang A.J., Landman S.L., Nicholson S.C., Silverstain S.C. Elastase-mediated fibrinogenolysis by chemoattractant-stimulated neutrophils occurs in the presence of physiological concentrations of antiproteases. *J. Exp. Med.* 1987; 166(6): 1836–50. <https://doi.org/10.1084/jem.166.6.1836>
27. Papayannopoulos V., Medzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191(3):

- 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
28. Freuzel E., Korenbaum E., Hagermann J., Ochs M., Koepke J., Koczulla A.R., et al. Does augmentation with alpha-1 antitrypsin affect neutrophil extracellular traps formation? *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8(7): 1023–5. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4701>
 29. Hermant B., Biber T.S., Concord E., Dublet B., Weidenhant M., Vernet T., et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during transmigration. *J. Biol. Chim.* 2003; 278(16): 14002–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300351200>
 30. Tang A.H., Brunn G.J., Cascalho M., Platt J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis and related conditions. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82(2): 282–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.1206752>
 31. Ungurs M.J., Sinden N.J., Stockley R.A. Progranulin is a substrate for neutrophil elastase and proteinase 3 in the airway and its concentration correlates with mediators of airway inflammation in COPD. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2014; 306(1): L80–7. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00221.2013>
 32. Panagiotidis N.G., Hofbauer T.M., Ondracek A.S., Mangold A., Winker R., Land I.M. Cathepsin G bypasses the classic renin angiotensin system, leading to enhanced neutrophil extracellular trap formation. *Atherosclerosis.* 2020; 315: E123. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.377>
 33. Carp H., Miller F., Hoidal J.R., Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha-1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1982; 79(6): 2041–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.2041>
 34. Даренская М.А., Колесникова Л.И., Колесников С.И. COVID-19: окислительный стресс и актуальность антиоксидантной терапии. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2020; 75(4): 318–25. <https://doi.org/10.15690/vramn1360>
 35. Yu Z., Persson H.L., Eaton J.W., Brunk U.T. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34(10): 1243–52. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00109-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00109-6)
 36. Silva M.T. Bacteria-induced secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88(5): 885–96. <https://doi.org/10.1189/jlb.0410205>
 37. Pham C.T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 40(6–7): 1317–33. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.008>
 38. Bank U., Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 69(2): 197–206. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.2.197>
 39. Shpacovitch V., Fild M., Hollenberg M.D., Luger T.A., Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 83(6): 1309–22. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108001>
 40. Hollenberg M.D. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): proteinases as hormone-like messengers: PARs and more. *J. Pharmacol. Sci.* 2005; 97(1): 8–13. <https://doi.org/10.1254/jphs.fmj04005x2>
 41. Boxio R., Wartelle J., Nawrocki-Raby B., Legrange B., Mallet L., Hirche T., et al. Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium. *Respir. Res.* 2016; 17(1): 129. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0449-x>
 42. Suzuki T., Yamashita C., Zemans R.L., Brioms N., Linden A.V., Downey G.P. Leukocyte elastase induces lung epithelial apoptosis via PAR-1, NF-kappaB and p53-dependent pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2009; 41(6): 742–55. <https://doi.org/10.1165/rmb.2008-0157oc>
 43. Crilly A., Parmer H., Nickdel M.B., Dunning L., Lockhart J.C., Plevin R., et al. Immunomodulatory role of proteinase-activated receptor-2. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71(9): 1559–66. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200869>
 44. Bucurenci N., Blake D.R., Chidwick K., Winyard P.G. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha-1 antitrypsin. *FEBS Lett.* 1992; 300(1): 21–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80156-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80156-B)
 45. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol.* 2016; 7: 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>
 46. Okeke E.B., Lonttit C., Fry C., Najafabadi A.H., Han K., Nemzek J., et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular traps formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials.* 2020; 238: 119836. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119836>
 47. Millet J.K., Whittaker G.R. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2015; 202: 120–34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
 48. Belauzard S., Madu I., Whittaker G.R. Elastase mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites with the S2 domain. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(30): 22758–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103275>
 49. Matsuyama S., Ujike M., Morikawa S., Tashiro M., Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(35): 12543–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503203102>
 50. Ami Y., Nagata N., Shirato K., Watanabe R., Iwata N., Nakagaki K., et al. Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(2): 118–27. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00011.x>
 51. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтаидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. *Иммунология.* 2015; 36(4): 257–65.
 52. Аширметов А.Х., Мавлянов И.Р., Мавлянов З.И., Жарылкасынова Г.Ж. COVID-19: известные препараты, новые возможности. *Анализ риска здоровью.* 2020; (4): 170–80. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.4.19>
 53. Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н., Ляпин М.Н., Костюкова Т.А., Малюкова Т.А. и соавт. Влияние биологических свойств чумного микроба на развитие апоптоза лейкоцитов крови человека в системе in vitro. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2007; (1): 85–9.
 54. Pulaverdhan S., Prasanthi M., Ramachandran A., Grant R., Snider T.A., Chow V.T.K., et al. Production of neutrophil extracellular traps contributes to the pathogenesis of Francisella tularemia. *Front. Immunol.* 2020; 11: 679. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00679>

REFERENCES

1. Makatsariya A.D., Slukhanchuk E.V., Bitsadze V.O., Khizroeva D.Kh., Tret'yakova M.V., Tsibizova V.I., et al. COVID-19, hemostasis disorders and risk of thrombotic complications. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2020; 75(4): 306–17. <https://doi.org/10.15690/vramn1368> (in Russian)
2. Thierry A., Roch B. Neutrophil extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>
3. Amelina E.L., Kashirskaya N.Yu., Shmarina G.A., Krasovskiy S.A., Kudlay D.A., Markova O.A., et al. Dornase alfa in the treatment of Covid-19: destruction of neutrophil extracellular traps. *Pul'monologiya.* 2020; 30(3): 344–9. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2020-30-3-344-349> (in Russian)
4. Fornasari P.M. COVID-19: Neutrophils «unfriendly fire» im-

- balance proteolytic cascades triggering clinical worsening and viral sepsis. Potential role explanation for convalescent plasma as «Firehose». *J. Blood Res. Hematol. Dis.* 2020; 5(2). [https://doi.org/10.37532/jbhrd.2020.5\(2\).120](https://doi.org/10.37532/jbhrd.2020.5(2).120)
5. Thierry A.R. Anti-protease treatments targeting plasmin(ogen) and neutrophil elastase maybe beneficial in fighting COVID-19. *Physiol. Rev.* 2020; 100(4): 1597–8. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2020>
 6. Bai H., Hippensteel J., Leavitt A., Maloney J.P., Beckham D., Garcia C., et al. Hypothesis: alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med. Hypothesis.* 2021; 146: 110394. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110394>
 7. De Serres F., Blanco I. Role alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J. Internal Medicine.* 2014; 276(4): 311–35. <https://doi.org/10.1111/joim.12239>
 8. Pott G.B., Chan E.D., Dinarello C.A., Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J. Leukoc. Biology.* 2009; 85(5): 886–95. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208145>
 9. Korkmaz B., Horvitz M.S., Jenne D.E., Ganthier F. Neutrophil elastase, protease 3 and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62(4): 726–59. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002733>
 10. Yarovaya G.A. Properties and clinical diagnostic value of pancreatic and polymorphonuclear leukocyte elastase determination. *Laboratornaya meditsina.* 2006; 8: 43–9. (in Russian)
 11. Yoshikura H. Epidemiological correlation between COVID-19 and epidemical prevalence of α -1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2020; 3(2): 73–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01068>
 12. Wettstein L., Weil T., Conzelmann C., Müller J.A., Groß R., Hirschenberger M., et al. Alpha-1-antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 2020; 12(1): 1726. DOI: 10.1038/s41467-021-21972-0
 13. Jourdain M., Carrette O., Tournays A., Fourrier F., Mizon C., Mangalaboyi J., et al. Effects of inter- α -inhibitor in experimental endotoxic shock and disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156(6): 1825–33. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.6.9611100>
 14. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Siddiquey M., Schilke R.M., Woodlard M.D., Zang H., et al. In plain sight: the role of alpha-1 antitrypsin in COVID-19 pathogenesis and therapeutics. *bioRxiv.* 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248880>
 15. Zerimech F., Jourdain M., Ouraed B., Bouche-careilh M., Seudid B., Duhamel A., et al. Protease-antiprotease imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021; 59(8): e330–e334. <https://doi.org/10.1515/ccim-2021-0137>
 16. Akgun E., Tuzuner M.B., Suhin B., Kilercik K.M., Kulah S., Cakiroglu H.V., et al. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One.* 2020; 15(10): e0240012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240012>
 17. Zheutlin L.M., Thonar E., Jacobs E.R., Hanley M.E., Balk R.A., Bone R.C. Plasma elastase levels in the adult respiratory distress syndrome. *J. Crit. Care.* 1986; 1(1): 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0883-9441\(86\)80115-0](https://doi.org/10.1016/S0883-9441(86)80115-0)
 18. Madoiwa S., Tanaka H., Nagahama Y., Dokai M., Kashiwakura Y., Ishiwata A. Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* 2011; 127(4): 349–55. <https://doi.org/10.1016/j.tromres.2010.12.008>
 19. Kawabata K., Hagio T., Matsuoka S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 451(1): 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02182-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02182-9)
 20. Dotsenko V.L., Spirina A.Ya., Makinskiy A.I., Neshkova E.A., Ershikova Yu.E., Yarovaya G.A. Leukocyte elastase in plasma of patients with pulmonary tuberculosis and its part in blood coagulation disturbances. *Voprosy meditsinskoy khimii.* 2000; 46(2): 176–83. (in Russian)
 21. Gabazza E.C., Taguchi O., Yamakami T., Machishi M., Ibata H., Suzuki S. Correlation between increased granulocyte elastase release and activation of blood coagulation in patients with lung cancer. *Cancer.* 1993; 72(7): 2134–40. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19931001\)72:7%3C2134::aid-cnrc2820720712%3E3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931001)72:7%3C2134::aid-cnrc2820720712%3E3.0.co;2-8)
 22. Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in Covid-19. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny.* 2020; 48(S1): S43–50. <https://doi.org/10.18786/2072-05-05-2020-48-029> (in Russian)
 23. Da Cruz D.B., Helms J., Aquino L.R., Steil L., Cougordan L., Broussard C., et al. DNA-bound elastase of neutrophil extracellular traps degrades plasminogen, reduces plasmin formation, and decreases fibrinolysis: proof of concept in septic shock plasma. *FASEB J.* 2019; 33(12): 14270–80. <https://doi.org/10.1096/fj.201901363RRR>
 24. Liou T.G., Campbell E.J. Non-isotropic enzyme-inhibitor interactions: a novel non-oxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry.* 1995; 34(49): 16171–7. <https://doi.org/10.1021/bi.0049a032>
 25. Owen C.A., Campbell M.A., Sunnes P.L., Boukedes S.S., Campbell E.J. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteases. *J. Cell Biol.* 1995; 131(3): 775–89. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.775>
 26. Weitz J.I., Huang A.J., Landman S.L., Nicholson S.C., Silverstein S.C. Elastase-mediated fibrinogenolysis by chemoattractant-stimulated neutrophils occurs in the presence of physiological concentrations of antiproteases. *J. Exp. Med.* 1987; 166(6): 1836–50. <https://doi.org/10.1084/jem.166.6.1836>
 27. Papayannopoulos V., Medzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191(3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
 28. Freuzel E., Korenbaum E., Hagermann J., Ochs M., Koepke J., Koczulla A.R., et al. Does augmentation with alpha-1 antitrypsin affect neutrophil extracellular traps formation? *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8(7): 1023–5. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4701>
 29. Hermant B., Biber T.S., Concord E., Dublet B., Weidenhaur M., Vernet T., et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during transmigration. *J. Biol. Chim.* 2003; 278(16): 14002–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300351200>
 30. Tang A.H., Brunn G.J., Cascalho M., Platt J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis and related conditions. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82(2): 282–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.1206752>
 31. Ungurs M.J., Sinden N.J., Stockley R.A. Progranulin is a substrate for neutrophil elastase and proteinase 3 in the airway and its concentration correlates with mediators of airway inflammation in COPD. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2014; 306(1): L80–7. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00221.2013>
 32. Panagiotidis N.G., Hofbauer T.M., Ondracek A.S., Mangold A., Winker R., Land I.M. Cathepsin G bypasses the classic renin-angiotensin system, leading to enhanced neutrophil extracellular trap formation. *Atherosclerosis.* 2020; 315: E123. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.377>
 33. Carp H., Miller F., Hoidal J.R., Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha-1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1982; 79(6): 2041–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.2041>
 34. Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. COVID-19: oxidative stress and the relevance of antioxidant therapy. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2020; 75(4): 318–25.

- <https://doi.org/10.15690/vramn1360> (in Russian)
35. Yu Z., Persson H.L., Eaton J.W., Brunk U.T. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34(10): 1243–52. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00109-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00109-6)
 36. Silva M.T. Bacteria-induced secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88(5): 885–96. <https://doi.org/10.1189/jlb.0410205>
 37. Pham C.T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 40(6-7): 1317–33. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.008>
 38. Bank U., Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 69(2): 197–206. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.2.197>
 39. Shpacovitch V., Fild M., Hollenberg M.D., Luger T.A., Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 83(6): 1309–22. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108001>
 40. Hollenberg M.D. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): proteinases as hormone-like messengers: PARs and more. *J. Pharmacol. Sci.* 2005; 97(1): 8–13. <https://doi.org/10.1254/jphs.fmj04005x2>
 41. Boxio R., Wartelle J., Nawrocki-Raby B., Legrange B., Maleret L., Hirche T., et al. Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium. *Respir. Res.* 2016; 17(1): 129. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0449-x>
 42. Suzuki T., Yamashita C., Zemans R.L., Brioms N., Linden A.V., Downey G.P. Leukocyte elastase induces lung epithelial apoptosis via PAR-1, NF-kappaB and p53-dependent pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2009; 41(6): 742–55. <https://doi.org/10.1165/rncmb.2008-0157oc>
 43. Crilly A., Parmer H., Nickdel M.B., Dunning L., Lockhart J.C., Plevin R., et al. Immunomodulatory role of proteinase-activated receptor-2. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71(9): 1559–66. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200869>
 44. Bucurenci N., Blake D.R., Chidwick K., Winyard P.G. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha-1 antitrypsin. *FEBS Lett.* 1992; 300(1): 21–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80156-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80156-B)
 45. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol.* 2016; 7: 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>
 46. Okeke E.B., Lonttit C., Fry C., Najafabadi A.H., Han K., Nemzek J., et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular traps formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials.* 2020; 238: 119836. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119836>
 47. Millet J.K., Whittaker G.R. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2015; 202: 120–34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
 48. Belauzard S., Madu I., Whittaker G.R. Elastase mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites with the S2 domain. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(30): 22758–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103275>
 49. Matsuyama S., Ujike M., Morikawa S., Tashiro M., Taguchi F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(35): 12543–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503203102>
 50. Ami Y., Nagata N., Shirato K., Watanabe R., Iwata N., Nakagaki K., et al. Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(2): 118–27. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00011.x>
 51. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at «Old players» on the immunological field. *Immunologiya.* 2015; 36(4): 257–65. (in Russian)
 52. Ashirmetov A.Kh., Mavlyanov I.R., Mavlyanov Z.I., Zharylkasynova G.Zh. COVID-19: Well-known drugs, new opportunities. *Analiz riska zdorov'yu.* 2020; (4): 170–80. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.4.19> (in Russian)
 53. Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N., Lyapin M.N., Kostyukova T.A., Malyukova T.A., et al. Effects of Yersinia pestis biologic characteristics on the development of human blood leukocyte apoptosis in the in vitro system. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2007; (1): 85–9. (in Russian)
 54. Pulaverdran S., Prasanthi M., Ramachandran A., Grant R., Snider T.A., Chow V.T.K., et al. Production of neutrophil extracellular traps contributes to the pathogenesis of Francisella tularemia. *Front. Immunol.* 2020; 11: 679. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00679>

Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович[✉] — д.б.н., в.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., г.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Участие авторов: Кравцов А.Л. — написание статьи. Бугоркова С.А. — коррекция и одобрение статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 30.04.2021;
принята к публикации 08.07.2021;
опубликована 30.10.2021

Information about the authors

Aleksandr L. Kravtsov[✉] — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), deputy head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>.

Author contribution: Kravtsov A.L. — writing an article. Bugorkova S.A. — correction and approval of the article. 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 30.04.2021;
accepted for publication 08.07.2021;
published 30.10.2021



Применение штамма MVA вируса вакцины для создания рекомбинантных векторных вакцин против актуальных арбовирусных инфекций

Стовба Л.Ф., Кротков В.Т., Мельников С.А., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В.

48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Россия

Аннотация

Эпидемические трансмиссивные вирусные инфекции представляют собой серьёзную угрозу для здравоохранения многих стран. Для большинства из них отсутствуют средства специфической профилактики. В настоящее время одним из перспективных направлений борьбы с вирусными лихорадками является создание векторных вакцин, в том числе на основе штамма MVA, которые практически не вызывают побочных реакций. Безопасность штамма MVA и отсутствие реактогенности рекомбинантных вакцин, разработанных на его основе, показана в многочисленных клинических испытаниях.

В статье рассматриваются результаты испытаний подобных профилактических препаратов против вирусных лихорадок: Крымской-Конго геморрагической лихорадки, лихорадки долины Рифт, жёлтой лихорадки, лихорадки Чикунгунья и Зика.

Их иммуногенность оценивалась на иммунокомпетентных и иммунодефицитных белых мышах, а протективная эффективность — на иммунодефицитных белых мышах, дефектных по α -, β -рецепторам интерферона, на которых моделируют эту инфекцию. Почти все разработанные рекомбинантные вакцины, экспрессирующие иммунодоминантные антигены, обеспечивали 100% защитную эффективность. Показано, что, хотя вакцина, экспрессирующая структурные белки вируса Зика, индуцировала антитела против специфических вирусных гликопротеинов, её применение может вызывать опасность для профилактики лихорадки Зика у лиц, переболевших лихорадкой денге, в связи с наличием феномена антителозависимого усиления инфекции при заболеваниях, вызванных антигенно-родственными флавивирусами. По этой причине для иммунизации против лихорадки Зика разработана вакцина, экспрессирующая неструктурный белок NS-1.

Сконструированная на основе штамма MVA вакцина против жёлтой лихорадки обладала такой же иммуногенностью, что и коммерческая вакцина 17D, однако по уровню безопасности превосходила её.

Ключевые слова: вирус вакцины, штамм MVA, праймирование, бустирование, Крымская-Конго геморрагическая лихорадка, лихорадка долины Рифт, жёлтая лихорадка, лихорадка Чикунгунья, лихорадка Зика

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: Стовба Л.Ф., Кротков В.Т., Мельников С.А., Павельев Д.И., Черникова Н.К., Борисевич С.В. Применение штамма MVA вируса вакцины для создания рекомбинантных векторных вакцин против актуальных арбовирусных инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):579–587. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-102>

Using the vaccinia virus MVA strain for developing recombinant vector vaccines against current arboviral infections

Lyudmila F. Stovba, Victor T. Krotkov, Sergey A. Melnikov, Dmitriy I. Paveliev, Natalia K. Chernikova, Sergey V. Borisevich

48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia

Abstract

Epidemic vector-borne viral infections pose a serious threat to public health worldwide. There is currently no specific preventive treatment for most of them. One of the promising solutions for combating viral fevers is development of vector vaccines, including MVA-based vaccines, which have virtually no adverse side effects. The safety of the MVA strain and absent reactogenicity of recombinant MVA vaccines have been supported by many clinical trials.

The article focuses on test results for similar preventive products against viral fevers: Crimean-Congo hemorrhagic fever, Rift Valley fever, yellow fever, Chikungunya and Zika fevers.

Their immunogenicity was evaluated on immunocompetent and immunocompromised white mice; their protective efficacy was assessed on immunocompromised white mice deficient in IFN- α/β receptors, that are used for experimental modeling of the infection. Nearly all the new recombinant vaccines expressing immunodominant antigens demonstrated 100% protective efficacy. It has been found that although the vaccine expressing Zika virus structural proteins induced antibodies against specific viral glycoproteins, it can be associated with high risks when used for prevention of Zika fever in individuals who had dengue fever in the past, due to the phenomenon known as antibody-dependent enhancement of infection, which can occur in diseases caused by antigenically related flaviruses. For this reason, the vaccine expressing non-structural protein 1 (NS1) was developed for vaccination against Zika fever.

The yellow fever vaccine developed on the MVA platform had immunogenicity similar to that of the commercial 17D vaccine, outperforming the latter in safety.

Keywords: *vaccinia virus, MVA strain, priming, boosting, Crimean-Congo hemorrhagic fever, Rift Valley fever, yellow fever, Chikungunya fever, Zika fever*

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: Stovba L.F., Krotkov V.T., Melnikov S.A., Paveliev D.I., Chernikova N.K., Borisevich S.V. Using the vaccinia virus MVA strain for developing recombinant vector vaccines against current arboviral infections. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):579–587. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-102>

Введение

Модифицированный вирус вакцины, штамм MVA, лицензирован как противооспенная вакцина в Европе и Канаде, в настоящее время проводятся работы по его клиническому использованию в США. Этот штамм был получен из родительского штамма Анкара, вируса вакцины, за счёт более чем 575 пассажей на фибробластах куриных эмбрионов. На протяжении этих пассажей в геноме штамма произошло множество мутаций и протяжённых делеций относительно ДНК исходного штамма, что привело к его сильной аттенуации и потере способности реплицироваться в клетках млекопитающих [1]. По проявляемой безопасности вакцины на его основе относят к противооспенным препаратам третьего поколения [2]. После отмены обязательной вакцинации против натуральной оспы популяционный иммунитет практически исчез и поэтому не препятствует применению векторных вакцин на основе вируса вакцины [3, 4]. До отмены обязательного оспопрививания штамм MVA использовался как праймирующая вакцина, которой было проиммунизировано 120 тыс. человек в Германии в 1970 г. [5]. Применение штамма MVA не вызывало системных побочных реакций и изредка сопровождалось лёгкими реакциями в месте инъекции. Его безопасность была установлена в клинических испытаниях на здоровых волонтерах 18–30 лет [6], волонтерах с сердечно-сосудистыми заболеваниями [7], в возрастной группе 56–80 лет [8], в возрасте 18–40 лет с атопическим дерматитом [9], больных туберкулёзом [10] и инфицированных

ВИЧ [11]. Это обусловило разработку векторных вакцин на основе штамма MVA против различных вирусных инфекций.

Крымская-Конго геморрагическая лихорадка

Крымская геморрагическая лихорадка, переносимая клещами *Hyalomma*, впервые описана в 1945 г., когда была установлена вирусная этиология этой инфекции [12]. Однако в 1969 г. было показано, что вирус, вызывающий это заболевание, был идентичен вирусу, выделенному в Конго в 1956 г. [13], и он получил международное название возбудителя Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ).

Ареал ККГЛ охватывает эндемичные регионы Африки, Азии и Европы. Кроме того, известны завозные случаи ККГЛ в эндемичных странах. Например, в 2012 г. в Великобритании был госпитализирован пациент с летальным исходом заболевания, возвратившийся из Афганистана [14]. Вакцина первого поколения, изготовленная в Болгарии на основе вирусосодержащей суспензии головного мозга мышей-сосунков и инактивированная хлороформом, с успехом используется в этой стране с 1974 г. Она вызывает формирование клеточного и гуморального иммунных ответов при введении только в больших дозах [15] и не нашла широкого применения в других эндемичных регионах. Недавно полученная ДНК-вакцина, экспрессирующая гликопротеин вируса ККГЛ, индуцировала специфические нейтрализующие антитела приблизительно

но у половины вакцинированных мышей [16]. Вакцина, экспрессирующая гликопротеин вируса ККГЛ в трансгенных листьях табака, индуцировала у мышей образование IgG и IgA [17].

Возможность оценки протективной активности указанных вакцин появилась только в 2010 г., когда было установлено, что взрослые мыши линии A129, дефектные по STAT-1 или α -, β -рецепторам интерферона, чувствительны к ККГЛ и могут использоваться для моделирования этой инфекции [18].

В 2014 г. появилось первое сообщение о создании и испытании рекомбинантной MVA-вакцины, экспрессирующей полноразмерный предшественник гликопротеина вируса ККГЛ — MVA-GP [14]. Вакцину вводили иммунокомпетентным 129 Sv/Ev мышам и иммунодефицитным A129 мышам, затем через 14 сут их заражали летальной дозой вирулентного вируса (таблица).

Иммунизация индуцировала гуморальный иммунный ответ, представленный в основном IgG-антителами, и клеточный ответ, специфичный к гликопротеину вируса ККГЛ. У иммунизированных мышей не отмечалось симптомов заболевания. Иммунодефицитные мыши были полностью защищены от заражения летальной дозой нативного вируса [14].

Необходимость формирования клеточного и гуморального иммунного ответа для защиты от возможного дальнейшего заражения вирулентным вирусом показана в исследованиях по пассивному переносу иммунной сыворотки и Т-лимфоцитов неиммунизированным мышам линии A129 [19].

Помимо уже испытанной вакцины, экспрессирующей вирусный гликопротеин [14], был сконструирован рекомбинантный штамм MVA со встроенным геном нуклеопротеина (NP) вируса ККГЛ. Авторы полагали, что NP как доминантный антиген, высококонсервативный у штаммов рода *Nairovirus* семейства *Bunyaviridae*, будет достойной альтернативой гликопротеину [20]. Кроме того, вакцины, экспрессирующие нуклеопротеин, обладали протективным эффектом у двух других представителей этого семейства: хантавируса (род *Hantavirus*) и возбудителя лихорадки долины Рифт (род *Phlebovirus*) [21].

Иммуногенность кандидата в вакцины MVA-NP3010 оценивали на мышах линий A129 и 129 Sv/Ev при их двукратной вакцинации. Через 14 сут их заражали летальной дозой нативного вируса. При оценке иммуногенности этого кандидата в вакцину установлено, что у всех животных вырабатывались NP-специфические антитела и NP-специфический Т-клеточный ответ. Однако, несмотря на индуцированный иммунный ответ, все мыши после последующего заражения летальной дозой нативного вируса погибли на 4–5-е сутки [20].

Следовательно, в настоящее время только конструкция MVA-GP является единственной, обла-

дающей эффективностью против ККГЛ, что делает её возможным кандидатом в вакцины.

Лихорадка долины Рифт

Вирус лихорадки долины Рифт передаётся через укусы комаров и является причиной периодических вспышек заболевания у домашнего скота и людей во многих африканских странах. После вспышек на континенте заболевание перекинулось на Аравийский полуостров. Имеется эффективная живая вакцина «Клон 13», которая применяется во многих странах Африки, но только для скота, и не разрешена к применению на людях [22].

В США в 1967 г. была создана инактивированная живая вакцина для иммунизации людей. Она представляет собой инактивированный формалином препарат пантотропного вируса (штамм Entebbe). Данная вакцина была использована для иммунизации более чем 4000 человек. У 80–85% вакцинированных наблюдался значительный уровень нейтрализующих антител через 14 дней после иммунизации. У пациентов, которые прошли полный курс иммунизации с последующей ревакцинацией, нейтрализующие антитела к вирусу долины Рифт сохранялись несколько лет [23].

Для защиты человека были разработаны кандидаты в вакцины на основе штамма MVA и ДНК-вакцины (PCMV), экспрессирующие вирусные гликопротеины (Gn/Gc) или нуклеопротеин (N) [24]. Оценка уровня и защитной эффективности индуцированного иммунного ответа, проведённая на иммунокомпетентных мышах линии BALB/c, выявила, что у мышей, иммунизированных MVA-Gn/Gc, наблюдался умеренно выраженный гуморальный и CD8⁺ Т-клеточный ответ, специфичный к вирусному гликопротеину, и только эта группа мышей была полностью защищена от заражения летальной дозой вирулентного вируса. Иммунизация ДНК-вакциной, также экспрессирующей вирусные гликопротеины, вызывала индукцию антител, сравнимую по титрам с таковой при иммунизации MVA-Gn/Gc, однако у мышей регистрировались симптомы заболевания и частичная гибель. Ни одна из вакцин, экспрессирующих нуклеопротеин, полностью не защищала животных от дальнейшего заражения летальной дозой вирулентного вируса, даже в сочетании MVA-Gn/Gc + MVA-N. Иммунизация иммунодефицитных мышей линии 129Sv/EvIFNAR^{-/-} вакциной MVA-Gn/Gc не обеспечивала их защиту от гибели при заражении летальной дозой вируса, что указывает на необходимость полноценного природного иммунитета в защите против лихорадки долины Рифт [24].

Жёлтая лихорадка

Жёлтая лихорадка — тяжёлое заболевание, переносимое комарами и эндемичное в регионах тропической Африки и Южной Америки. По данным

Результаты оценки иммунного ответа, индуцированного вакцинными препаратами на основе штамма MVA, на иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышах
Assessment results of the immune response induced by MVA-based vaccines in immunocompetent and immunocompromised mice

Заболевание Disease	Экспрессируемые белки Expressing proteins	Индуцируемый иммунный ответ / Induced immune response				Источники литературы References	
		Гуморальный / humoral		Т-клеточный / T-cellular			
		у иммунокомпетентных мышей on immunocompetent mice	у иммунодефицитных мышей on immunocompromised mice	у иммунокомпетентных мышей on immunocompetent mice	у иммунодефицитных мышей on immunocompromised mice		
ККГП Crimean-Congo haemorrhagic fever	Гликопротеин GP Glycoprotein GP	+	+	+	+	100%	14
	Нуклеопротеин NP Nucleoprotein NP	+	+	+	+	Гибель на 4–5-е сутки Death on days 4–5	20
Лихорадка долины Рифт Rift Valley fever	Гликопротеины Gn/Gc Glycoprotein Gn/Gc	+	+	+	Нет данных No date	Частичная. У иммунокомпетентных — полная Partial. On immunocompetent — complete	24
Желтая лихорадка Yellow fever	Предшественники мембранного и оболочечного белков (prMR) Precursors of membrane and envelope proteins (prMR)	+	Нет данных No date	+	Нет данных No date	Полная Complete	27
Лихорадка Чикунгунья Chikungunya fever	C, E3, E2, 6K, E1 E3, E2	+	Нет данных No date	+	Нет данных No date	Полная Complete	30
	6K, E1	Нет данных No date	+	Нет данных No date	+	Полная Complete	29
	E3, E2	Нет данных No date	+	Нет данных No date	Нет данных No date	Частичная Partial	31
Лихорадка Зика Zika fever	Преимбранный (prM) и оболочечный (E) Премембранный (prM) and envelope (E)	+	+	+	Нет данных No date	Полная Complete	35
	Неструктурный белок-1 (NS-1)	+	Нет данных No date	+	Нет данных No date	У иммунокомпетентных — полная On immunocompetent — complete	34

ВОЗ, на 200 тыс. заболевших приходится 30 тыс. летальных исходов [25]. В 1937 г. была получена живая вакцина с использованием аттенуированного штамма 17D. Эта вакцина широко применяется и в настоящее время. Общее число иммунизированных составляет примерно 400 млн человек. Ранее она считалась одной из самых безопасных и иммуногенных. Однако начали отмечаться случаи поствакцинальных заболеваний с нейротропными и висцеротропными проявлениями, особенно у лиц старше 60 лет и женщин детородного возраста. Серьёзные побочные реакции, включая летальные исходы, были зарегистрированы в Исландии, Бразилии, США, Австралии и Таиланде [26]. В связи с этим возросла актуальность разработки новой, более безопасной вакцины.

Поскольку оболочечные белки играют доминирующую роль в индуцировании защитного иммунного ответа, были созданы векторные вакцины на основе двух дефектных по репликации штаммов вируса вакцины MVA и DvV, у которого делетирован ген урацил-ДНК-гликозилазы и который также относится к противооспенным вакцинам третьего поколения, экспрессирующим предшественники мембранного и оболочечного белков (pMR), т.е. белков, аутентичных экспрессируемым штаммом 17D. Обе векторные вакцины сравнивали с коммерческой живой вакциной 17D по иммуногенности и безопасности при однократной внутримышечной иммунизации мышей линии BALB/c. Уровень индуцированного иммунного ответа оценивали после внутримозгового заражения иммунизированных животных вирулентным штаммом вируса жёлтой лихорадки в дозе более 1000 ЛД₅₀ для белых мышей [27].

В результате исследований установлено, что уровень гуморального и клеточного иммунного ответа для обоих кандидатов в вакцины был таким же, как и для вакцины 17D. Клеточный иммунный ответ был представлен функционально активными CD8⁺- и CD4⁺ Т-клетками, секретирующими интерферон-γ. Оба варианта полностью защищали мышей от летального заражения вирулентным вирусом. В отличие от классической вакцины 17D, безопасность кандидатов в вакцины на основе штаммов MVA и DvV была очень высокой, что выявлено при внутримозговом введении мышам линии BALB/c очень больших доз — от 1×10^5 до 1×10^7 ЦПД₅₀. Все мыши выжили, в отличие от контрольных, которых заражали дозами от 1×10^1 до 1×10^3 ЦПД₅₀ штамма 17D, при условии, что доза 1×10^3 ЦПД₅₀ была летальной для 100% мышей. Предшествующая вакцинация мышей вирусом вакцины не влияла на результаты иммунизации против жёлтой лихорадки [27].

Таким образом, рекомбинантные вакцины на основе обоих штаммов вируса вакцины, экспрессирующие предшественники мембранного и оболочечного белков, индуцировали гуморальный и клеточный иммунный ответ, защищающий от зара-

жения летальной дозой вируса жёлтой лихорадки. Они оказались более безопасными по сравнению с коммерческой вакциной 17D [27].

Лихорадка Чикунгунья

Возбудитель лихорадки Чикунгунья, переносимый комарами рода *Aedes*, относится к семейству *Togaviridae*. Впервые инфекция описана в 1952 г. в Танзании, а вирус был выделен в 1953 г. В 2005 г. зафиксирована большая вспышка этой инфекции на острове Ла Реюньон, откуда потом заболевание распространилось в различные регионы Африки и Юго-Восточной Азии, на острова Индийского океана, в Индию, южную Европу (Италия, Франция), Карибские острова и континентальную Америку. В целом зарегистрировано около 6 млн случаев [28, 29].

В настоящее время вакцины против лихорадки Чикунгунья нет. Известно, что наиболее иммуногенными являются живые аттенуированные вакцины, однако при их использовании всегда существует риск реверсии к исходному вирулентному штамму. Поэтому векторные вакцины на основе штамма MVA рассматриваются в качестве оптимальных современных вариантов для создания вакцин против этой инфекции.

Для получения вакцинного препарата был сконструирован рекомбинантный штамм MVA, содержащий структурные гены вируса С-Е3-Е2-6К-Е1 [30]. Для оценки уровня иммунного ответа одно- и двукратно иммунизированных мышей линии C57Bl/6 заражали летальной дозой вирулентного вируса через 7 нед после последней иммунизации.

Вакцина С-Е3-Е2-6К-Е1 вызывала иммунный ответ и полностью защищала животных от заражения летальной дозой даже при однократной иммунизации, причём у животных не наблюдалось симптомов болезни. Иммунный ответ был представлен сильным полифункциональным CD8⁺ Т-клеточным ответом, направленным, в основном, против Е1 и Е2 белков и иммунной CD8⁺ Т-клеточной памятью. Иммунизация стимулировала выработку высоких титров нейтрализующих IgG антител против вируса Чикунгунья, которые увеличивались при бустерной иммунизации. Помимо специфического иммунного ответа против вируса Чикунгунья формировались полифункциональный CD8⁺ Т-клеточный ответ и Т-клеточная память против вируса вакцины. Учитывая полученные результаты, авторы разработки предложили этот препарат в качестве кандидатной вакцины для вакцинопрофилактики у людей [30].

Примерно в то же время другая группа авторов [29] оценивала иммуногенность конструкции, основанной на рекомбинантном штамме MVA, экспрессирующем Е3- и Е2-белки вируса Чикунгунья. Эффективность этой вакцины оценивалась на иммунокомпетентных мышях линии BALB/c и

иммунокомпромиссных мышцах линии A129 при одно- и двукратной иммунизации. Через 2 нед после последней вакцинации животных заражали летальной дозой вирулентного вируса. При двукратной вакцинации BALB/с мыши были полностью защищены. Исходя из полученных результатов, авторы предлагают сконструированный ими рекомбинантный штамм MVA в качестве возможного кандидата в вакцину против лихорадки Чикунгунья [29].

С целью определения доли конкретных структурных белков вируса Чикунгунья, определяющих протективную активность векторных вакцин, были созданы рекомбинантные штаммы MVA, экспрессирующие отдельные структурные белки вируса Чикунгунья: MVA-6KE1, MVA-E3E2 и MVA-E3E-26KE1 (последний образовывал вирусоподобные частицы). Эффективность этих препаратов оценивали на иммунодефицитных мышцах линии AG129, которых через 6 нед после иммунизации заражали летальной дозой вирулентного вируса Чикунгунья [31]. Рекомбинантный вариант MVA-E3E26KE1 индуцировал более высокие уровни антител по сравнению с двумя другими и защищал, как и препарат MVA-E3E2, 100% мышей от дальнейшего заражения вирулентным вирусом даже при однократной иммунизации. Рекомбинант MVA-6KE1 защищал только 75% мышей. Учитывая предшествующие данные по экспрессии E1-, E2-белков, авторы пришли к выводу, что белок E2, и особенно его В-домен, наиболее существенен для формирования полной защиты иммунизированных мышей от летального заражения вирулентным вирусом [31, 32].

В настоящее время существует несколько кандидатов в вакцины против лихорадки Чикунгунья. В 2015 г. были проведены эксперименты по оценке следующих кандидатных препаратов: аттенуированный вирус с большой делецией в репликационном гене; вакцина на основе ДНК-репликона, в котором делетирован капсидный белок, и рекомбинантная MVA-вакцина со встроенными С-E3-E2-6K-E генами, которой иммунизировали *Macaca fascicularis* при различных схемах введения. Наилучшие результаты были получены в случае применения вакцины для создания бустерного эффекта [33].

Лихорадка Зика

Вирус, вызывающий лихорадку Зика, был впервые выделен в 1947 г. в Уганде [34]. На протяжении многих лет он был известен как этиологический агент спорадических лихорадочных заболеваний в Африке. Однако в 2007 г. произошла большая вспышка лихорадки Зика на островах Микронезии, затем в 2013 г. во Французской Полинезии. После регистрации вируса в конце 2014 г. в Бразилии пандемия этой инфекции быстро распространилась на регионы Южной, Центральной Америки и

бассейна Карибского моря. Его основными переносчиками, наряду с вирусом денге и Чикунгунья, являются комары *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*. В настоящее время случаи лихорадки Зика регистрируются в Южной и Центральной Америке, Африке и Юго-Восточной Азии и южных островах Тихого океана, что представляет потенциальную угрозу новой пандемии [34]. Кроме того, в 2015–2016 гг. зарегистрированы единичные завозные случаи заболевания в неэндемичных странах [35].

В большинстве случаев лихорадка Зика протекает бессимптомно либо в виде острого лихорадочного заболевания (без летальных исходов). В некоторых случаях у больных наблюдается неврологический синдром Гийена–Барре, встречающийся также при лихорадках денге, западного Нила и Чикунгунья. У новорождённых детей, родившихся у инфицированных женщин, отмечались случаи микроцефалии. Заражение новорождённых вирусом Зика может происходить также при вскармливании грудным молоком или переливании крови [35].

Вакцины против лихорадки Зика в настоящее время не существует. Возможность быстрого распространения этого заболевания обуславливает необходимость создания безопасного и эффективного профилактического препарата, пригодного в том числе для иммунизации беременных женщин. Поскольку безопасность штамма MVA показана в многочисленных испытаниях на волонтерах, а также на беременных макаках [36], то на его основе была сконструирована экспериментальная вакцина против лихорадки Зика (MVA-ZIKV), экспрессирующая премолекулный (prM) и структурный (E) белки вируса Зика (prM-E) [35]. Экспрессируемые белки prM-E продуцировали вирусоподобные частицы в инфицированных клетках.

Иммунизация иммунокомпетентных мышей линии BALB/с индуцировала образование нейтрализующих антител против различных штаммов вируса Зика, а также полифункциональный вирус-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ.

Для оценки защитной эффективности конструкции MVA-ZIKV одно- или двукратно иммунизировали иммунодефицитных IFNAR-1 (дефектные по α -, β -рецепторам интерферона) мышей, после чего через 4 нед их заражали летальной дозой вирулентного вируса [35]. Последующее бустирование значительно повышало титры вируснейтрализующих антител и значительно снижало показатели вирусемии. В течение 15 сут наблюдения все мыши оставались живыми. Исходя из полученных результатов, данная конструкция предлагается авторами для производства новой, безопасной, высокоиммунотропной и относительно недорогой вакцины против лихорадки Зика [35].

Однако при флавивирусных инфекциях значительную роль в ответе со стороны иммунной

системы человека на возбудитель играет феномен антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement — ADE). Феномен ADE заключается в том, что вирусспецифические антитела усиливают проникновение вируса в фагоцитирующие клетки посредством взаимодействия с рецептором FcR и/или рецепторами комплемента на поверхности фагоцитирующих клеток. Среди инфекционных процессов, вызываемых флавивирусами, феномен ADE наиболее изучен при лихорадке денге и желтой лихорадке [37, 38]. Первичная инфекция, вызванная одним из 4 вирусов денге (Д1, Д2, Д3, Д4), чаще всего протекает у человека бессимптомно и создаёт пожизненный иммунитет к вирусу серотипа, её вызвавшего. Если же он сталкивается с вирусом другого серотипа, то благодаря FcR-ADE-феномену болезнь может протекать в форме тяжёлой геморрагической лихорадки с вероятностью летальных исходов до 15%. Однако ареалы распространения лихорадки Зика и лихорадки денге в основном совпадают, что обусловлено общими переносчиками. Поскольку вирусы Зика и денге являются родственными в антигенном отношении (относятся к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*), то антитела к вирусу денге могут усиливать инфекцию, вызванную вирусом Зика, и наоборот, антитела против гликопротеинов вируса Зика смогут утяжелять течение лихорадки денге [39].

Поэтому другой группой авторов предлагается вакцина на основе штамма MVA, экспрессирующая неструктурный белок 1 (non-structural-1 — NS-1) вируса Зика, который существует в нативной форме в инфицированных клетках [34]. Выбор NS-1 белка обусловлен также тем фактом, что против него вырабатывался протективный иммунный ответ, как и у других флавивирусов, что показано в экспериментах с использованием мышшиной модели [38]. Иммуногенность и защитную эффективность конструкции MVA-ZIKV-NS-1 оценивали на новой модели — иммунокомпетентных CD-1/ICR мышках при одно- или двукратной иммунизации. Даже после однократной иммунизации гуморальный ответ против NS-1-белка, уровень которого повышался после бустирования, полностью защищал мышей от гибели при последующем внутримозговом заражении летальной дозой вирулентного вируса при отсутствии симптомов заболевания. Через 10 дней после иммунизации у мышей выявлялся вирусспецифический CD8⁺ Т-клеточный ответ. Вирус не определялся в головном мозге иммунных мышей через 21 сут после заражения. Наличие предшествующего иммунитета к MVA-вектору не влияло на результаты иммунизации. Основываясь на этих результатах, авторы считают, что серопозитивные лица, проживающие в регионах, эндемичных по вирусу денге или другим флавивирусам, не будут подвержены развитию феномена ADE после имму-

низации вакциной ZIKV-NS-1 [34].

Результаты исследований иммуногенности вакцинных препаратов на основе штамма MVA против возбудителей арбовирусных инфекций представлены в таблице. Данные свидетельствуют о том, что рекомбинантные вакцины на основе штамма MVA обладают выраженной иммуногенностью. При встраивании генов оболочечных гликопротеинов индуцированный иммунный ответ защищал иммунодефицитных мышей от заражения заведомо летальной дозой вирулентного вируса. При встраивании других генов выявлена частичная защита животных.

Кроме того, установлено, что вакцина против жёлтой лихорадки на основе штамма MVA более безопасна по сравнению с классической аттенуированной вакциной 17D. Созданные конструкции пока испытаны только на лабораторных животных. В дальнейшем планируется оценка кандидатных препаратов в клинических испытаниях.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Meseda C.A., Atukorale V., Kuhn J., Schmeisser F., Weir J.P. Percutaneous vaccination as an effective method of delivery of MVA and MVA-vectored vaccines. *PLoS One*. 2016; 11(2): e149364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone0149364>
2. Volz A., Sutter G. Modified Vaccinia virus Ankara: History, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017; 97: 187–243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>
3. Melamed S., Israely T., Paran N. Challenges and achievements in prevention and treatment of smallpox. *Vaccines (Basel)*. 2018; 6(1): 8. <https://doi.org/10.3390/vaccines6010008>
4. Frey S.E., Winokur P.L., Salata R.A., El-Kamary S.S., Turley C.B., Walter E.B., et al. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE® smallpox vaccine using different strategies for post event scenario. *Vaccine*. 2013; 31(29): 3025–33. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.050>
5. Mair A., Stickl H., Muller H.K., Danner K., Singer H. The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl). *Zentralbl. Bakteriol. B*. 1978; 167(5-6): 375–90. (in German)
6. Von Krempelhuber B., Vollmar J., Pokorny R., Rapp P., Wulff N., Petzold B., et al. A randomized, double-blind, dose-finding phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE®. *Vaccine*. 2010; 28(5): 1209–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.030>
7. Zitzman-Roth E.-M., von Sonnenburg F., de la Motte S., Arndt-Wiedemann N., von Krempelhuber A., Urbler N., et al. Cardiac safety of modified vaccinia Ankara for vaccination against smallpox in a young, healthy study population. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0122653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122653>
8. Greenberg R.N., Hay C.M., Stapleton J.T., Marbury T.C., Wagner E., Kreitmeir E., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial investigating the safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara smallpox vaccine (MVA-BN®) in 56–80-year-old subjects. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0157335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157335>

9. Greenberg R.N., Hurley Y., Dinh V.V., Mraz S., Vera J.G., von Bredow D., et al. A multicenter, open-label, controlled phase II study to evaluate safety and immunogenicity of MVA smallpox vaccine (IMVAMUNE) in 18–40 year old subjects with diagnosed atopic dermatitis. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0138348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138348>
10. Sander C.R., Pathan A.A., Beveridge N.E., Poulton I., Minasian A., Alder N., et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85, in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2009; 179(8): 724–33. <https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1486oc>
11. Greenberg R.N., Overton E.T., Haas D.W., Frank I., Goldman M., von Krempelhuber A., et al. Safety, immunogenicity and surrogate markers of clinical efficacy for modified vaccinia Ankara as a smallpox vaccine in HIV-infected subjects. *J. Infect. Dis*. 2013; 207(5): 749–58. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis753>
12. Chumakov M.P. A new disease — Crimean hemorrhagic fever. In: Sokoljv A.A., Chumakov M.P., Kolachev A.A., eds. *Crimean Hemorrhagic Fever (Acute Infectious Capillary Toxicosis)*. Simferopol; 13–4.
13. Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1969; 131(1): 233–6. <https://doi.org/10.3181/00379727-131-33847>
14. Buttigieg K.R., Dowall S.D., Findlay-Wilson S., Miloszevska A., Rayner E., Hewson R., et al. A novel vaccine against Crimean-Congo hemorrhagic fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model. *PLoS One*. 2014; 9(3): e91516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091516>
15. Papa A., Papadimitriou E., Christova I. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain. *Scand. J. Infect. Dis*. 2011; 43(3): 225–9. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.540036>
16. Spik K., Shurtleff A., Guttieri M.C., McElroy A.K., Hooper J.W., Schmaljohn C., et al. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick borne encephalitis virus, Hantaan virus, and. *Vaccine*. 2006; 24(21): 4657–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.34>
17. Ghiasi S.M., Salmanian A.H., Chinicar S., Zakeri S. Mice orally immunized with a transgenic plant expressing the glycoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Clin. Vaccine Immunol*. 2011; 18(12): 2031–7. <https://doi.org/10.1128/CVI05352-11>
18. Bente D.A., Alimonti J.B., Shieh W.J., Camus G., Stroher U. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *J. Virol*. 2010; 84(21): 11089–100. <https://doi.org/10.1128/jvi.01383-10>
19. Dowall S.D., Graham V.A., Rayner E., Hunter L., Watson R., Taylor I., et al. Protective effects of modified vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo hemorrhagic require both cellular and humoral responses. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0156637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156637>
20. Dowall S.D., Buttigieg K.R., Findlay-Wilson S.J.D., Rayner E., Miloszevska A., Graham V.A., et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) viral vaccine expressing nucleoprotein is immunogenic but fails to confer protection against lethal disease. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2016; 12(2): 2519–27. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1078045>
21. Boshra H., Lorenzo G., Rodriguez F., Brun A.A. DNA vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and protects IFNAR(–/–) mice upon lethal virus challenge. *Vaccine*. 2011; 29(27): p4469-75. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.043>
22. Dungu B., Louw I., Lubisi A., Hunter P., von Teichman B.F., Bouloy M. Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley fever clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine*. 2010; 28(29): 4581–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.085>
23. The Subcommittee on Arbovirus Laboratory Safety of the American Committee on Arthropod-Borne Viruses. Laboratory safety for arboviruses and certain other viruses of vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1980; 29(6) 1359–81. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.1359>
24. López-Gil E., Lorenzo G., Hevia E., Borrego B., Eiden M., Groschup M., et al. A single immunization with MVA expressing immune-competent GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8⁺-T cell activation and protects mice against a lethal RVFV infection. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2013; 7(7): e2309. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002309>
25. WHO. Yellow fever. Yellow fever. Fact sheet. No 100; 2009. Available at: <https://who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
26. Lindsey N.P., Schroeder B.A., Miller E.R., Braun M.M., Hinckley A.F., Marano N., et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2008; 26(48): 6077–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.009>
27. Schäfer B., Holzer G., Joachimsthaler A., Coulibaly S., Schwendinger M., Crove B.A., et al. Pre-clinical efficacy and safety of experimental vaccines based on non-replication vaccinia vectors against Yellow fever. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024505>
28. Burt E.J., Rolph M.S., Rulli N.E., Mahalingam S., Heise M.T. Chikungunya re-emerging virus. *Lancet*. 2012; 379(9816): 662–71. [https://doi.org/10/S0140-6736\(11\)6028-x](https://doi.org/10/S0140-6736(11)6028-x)
29. Weger-Lucarelli J., Chu H., Aliota M.T., Partidos C.D., Osorio J.E. A novel MVA vectored Chikungunya virus vaccine elicits protective immunity in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8(7): e2970. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002970>
30. Garcia-Arriza J., Cepeda V., Hallengård D., Sorzano C., Kümmerer B.M., Liljestöm P., et al. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against Chikungunya infection. *J. Virol*. 2014; 88(6): 3527–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.03418-13>
31. Van den Doel P., Volz A., Roose J.M., Sewbalaksing V.D., Pijlman G., van Middelkoop I., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing glycoprotein E2 of Chikungunya virus protects AG129 mice against lethal challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8(9): 3101. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003101>
32. Weber C., Buchner S.M., Schnierle S. A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2015; 9(4): e0003684. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003684>
33. Roques P., Ljungberg K., Kümmerer B.M., Gosse L., Dereudre-Bosquet N., Tchitchec N., et al. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight*. 2017; 2(6): e83527. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.83527>
34. Brault A.C., Domi A., McDonald E.M., Talmi-Frank D., McCurley N., Basun R., et al. A Zika vaccine targeting NS1 protein immunocompetent adult mice in a lethal model. *Sci. Rep*. 2017; 7(1): 14769. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15039-8>
35. Perez P., Marin M.Q., Lázaro-Frias A., de Oya N.J., Blazquez A.B., Escribano-Romero E., et al. A vaccine based on a modified vaccinia virus Ankara vector expressing Zika virus structural proteins controls Zika virus replication in mice. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 17385. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35724-6>
36. Eudaileu J., Dennis M.L., Parker M.E., Phillips B.L., Huffman T.N., Bay C.P., et al. Maternal HIV-1 Env vaccination for systemic and breast milk immunity to prevent oral SHIV acquisition in infant macaques. *mSphere*. 2018; 3(1): e00505-17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00505-17>
37. Beatty P.R., Puerta-Guardo H., Killingbeck S.S., Glasner D.R., Hopkins K., Harris E., et al. Dengue virus NS1 triggers endo-

ОБЗОРЫ

- thelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(304): 304ra141. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3787>
38. Wan S.W., Lu Y.T., Huang C.H., Lin C.F., Anderson R., Liu H.S., et al. Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural

- protein 1. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092495>
39. Kawiecki A.V., Christofferson R.C. Zika virus-induced antibody response enhances dengue virus serotype 2 replication in vitro. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(6): 1357–60. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw377>

Информация об авторах

Стовба Людмила Федоровна — к.б.н., с.н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

Кротков Виктор Тимофеевич — к.м.н., с.н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Мельников Сергей Алексеевич — к.б.н., с.н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3497-5829>

Павельев Дмитрий Игоревич — н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3204-1897>

Черникова Наталья Константиновна — к.б.н., с.н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>

Борисевич Сергей Владимирович[✉] — член-корр. РАН, д.б.н., профессор, начальник 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, 48cnii@mil.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

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 11.03.2020;
принята к публикации 20.05.2021;
опубликована 25.10.2021

Information about the authors

Lyudmila F. Stovba — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

Victor T. Krotkov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Sergey A. Melnikov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3497-5829>

Dmitriy I. Paveliev — researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3204-1897>

Natalia K. Chernikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>

Sergey V. Borisovich[✉] — D. Sci. (Biol.) Professor, Corresponding Member of the RAS, Head, 48 Central Scientific Research Institut of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, 48cnii@mil.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

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 11.03.2020;
accepted for publication 20.05.2021;
published 25.10.2021

Review article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-167>



Epidemiologic characteristics of *Campylobacter* infections in high-income countries: a systematic review

Gurkeerat Gill[✉]

Independent researcher

Abstract

Introduction. The *Campylobacter* is the most common bacterial cause of foodborne illnesses in high-income countries. In contrast to other infectious diseases, the number of *Campylobacter* cases has increased in developed countries over the last ten years. A systematic review has been conducted to identify the factors contributing to incidence of *Campylobacter* infection in developed countries and to estimate it by age, sex, geography, and season.

Materials and methods. The review was limited to studies published in English from 2010–2021; eight nationwide surveillance and register-based cohort studies, which met the selection criteria, were included in the review.

Results. While the highest incidence of *Campylobacter* infection was reported among young children living in rural areas, the highest number of *Campylobacter* cases among adults was recorded in urban settings. Nevertheless, population-wise, children and older adults are most affected, while the incidence rates are higher in males than in females, with cases peaking every summer.

Conclusion. *Campylobacter* infection is a public health concern in high-income countries, being difficult to eradicate and having become an urgent challenge to the existing well-developed surveillance systems. Additionally, the threat of antibiotic resistance in *Campylobacter* is growing at an alarming rate. The reasons behind *Campylobacter* affecting more men than women as well as the age and geographic distribution of the infection still need thorough research.

Keywords: *Campylobacter* species, *Campylobacter* outbreaks, Analytical studies, Epidemiologic trends, National surveillance

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: Gill G. Epidemiologic characteristics of *Campylobacter* infections in high-income countries: a systematic review. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* = *Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):588–596.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-167>

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-167>

Эпидемиологическая характеристика инфекций *Campylobacter* в странах с высоким уровнем дохода: систематический обзор

Gurkeerat Gill[✉]

Независимый исследователь

Аннотация

Введение. *Campylobacter* — наиболее частая бактериальная причина болезней пищевого происхождения в странах с высоким уровнем доходов. В отличие от других инфекционных заболеваний, количество случаев *Campylobacter* увеличилось в развитых странах за последние 10 лет. Систематический обзор был проведён для выявления факторов, способствующих распространению инфекции *Campylobacter* в развитых странах, и оценки её по возрасту, полу, географии и сезону.

Материалы и методы. Обзор ограничен исследованиями, опубликованными на английском языке за 2010–2021 гг. В обзор были включены восемь общенациональных эпиднадзора и когортных исследований на основе регистров, которые соответствовали критериям отбора.

Результаты. В то время как самая высокая заболеваемость *Campylobacter* была зарегистрирована среди детей раннего возраста, живущих в сельской местности, самое большое количество случаев *Campylobacter* среди взрослых было зарегистрировано в городских условиях. Тем не менее больше всего страдают дети и пожилые люди, а уровень заболеваемости выше у мужчин, чем у женщин, причём пик заболеваемости приходится на каждое лето.

Заключение. Инфекция *Campylobacter* представляет собой проблему для общественного здравоохранения в странах с высоким уровнем доходов, её трудно искоренить, и она стала неотложной проблемой для существующих хорошо развитых систем эпиднадзора. Кроме того, угроза устойчивости *Campylobacter* к антибиотикам растёт с угрожающей скоростью. Причины, по которым *Campylobacter* поражает больше мужчин, чем женщин, а также возраст и географическое распространение инфекции ещё требуют тщательного исследования.

Ключевые слова: виды *Campylobacter*, вспышки *Campylobacter*, аналитические исследования, эпидемиологические тенденции, национальный надзор

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: Gill G. Эпидемиологическая характеристика инфекций *Campylobacter* в странах с высоким уровнем дохода: систематический обзор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):588–596.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-167>

Introduction

Campylobacter bacteria are bacterial enteric pathogens responsible for diarrheal illnesses such as gastroenteritis. It has been estimated that *Campylobacter* species cause around 96 million foodborne infections worldwide every year [1]. *Campylobacter* typically are comma or s-shaped gram-negative bacteria. The genus *Campylobacter* consists of 32 species and 9 subspecies; however, two species, *C. jejuni* and *C. coli* are most common pathogens in humans and the leading cause of *Campylobacter* outbreaks [2]. *Campylobacter* infection is classified both as zoonotic and foodborne. It has a zoonotic nature because it is carried by animals, being especially common for chickens [3] and is foodborne because it can be transmitted to humans through undercooked and cross-contaminated foods of animal origin. Furthermore, contaminated water, unpasteurized milk, and rare, though possible human-to-human transmission are also a common source of foodborne *Campylobacter* infection [4].

Campylobacter infection is usually self-limiting, causing mild to severe symptoms like diarrhea, abdominal cramps, fever, body aches, nausea, vomiting, and fatigue. However, *Campylobacter* infection can be invasive and fatal when pathogens enter the bloodstream, causing bacteraemia. *Campylobacter* infection can be severe among elderly, immunosuppressed, HIV-positive, alcohol-dependent individuals, or in patients who had gastrointestinal surgery [5]. Post-infection complications may include Guillain–Barré syndrome, Miller–Fisher syndrome [6], inflammatory bowel disease, colorectal cancer [7], and reactive arthritis [8].

Campylobacter infection poses a global threat to human health. It remains a persistent problem in developed countries. For example, in the United States, *Campylobacter* infections annually cause an estimated 1.3 million illnesses, around 13,240 hospitalizations,

and 119 deaths with a cost of \$1.7 billion in medical care [9]. Furthermore, in other high-income countries such as the United Kingdom and members of the European Union, in 2016, the EU member states collectively reported 246,307 infection cases [10], and 52,381 infection cases were reported in England and Wales [11]. In the same year, 243,49 confirmed cases of *Campylobacter* infection were reported in Australia. Hence, it is evident that infections caused by *Campylobacter* species place a substantial burden on the public health system in high-income countries.

Therefore, this study aims to assess epidemiologic characteristics of *Campylobacter* infection in high-income countries by analysing the national surveillance data and published studies. The objectives of this study are as follow:

- To explore the relationship between *Campylobacter* infection and age.
- To explore the relationship between *Campylobacter* infection and gender.
- To explore the relationship between *Campylobacter* infection and geographical factors.
- To explore the relationship between *Campylobacter* infection and seasonal factors.

Materials and methods

Protocol

This systematic review is conducted according to the PRISMA guidelines.

Search Strategy

The PubMed and Google Scholar search engines were used to find the articles with the following keywords and keyword combinations: *Campylobacter*, *Campylobacter* species, foodborne illness outbreaks, epidemiologic trends, epidemiologic characteristics,

analytical studies, national surveillance. The search span covered the period from 2010 through 2021, because the epidemiology of the pathogens is rapidly changing. The latest and updated data are instrumental for providing valid information about the current situation. A total of 1,628 and 25,100 articles were retrieved from PubMed and Google Scholar, respectively.

Inclusion Criteria

- Studies must be in English.
- Studies must be either analytical or based on national surveillance data.
- Studies must focus on outbreaks caused by *Campylobacter* infection.
- Studies must have multi-component settings and outcomes.
- Studies must be performed in high-income countries.
- Clinical data used in the studies must be limited to humans.

Exclusion Criteria

- Studies that are not in English.
- Studies that are not analytical or not based on national surveillance data.
- Studies that do not focus on high-income countries.

Data Extraction

The data extraction process was performed in four steps using the PRISMA guidelines (**Fig. 1**).

The four steps were as follows:

1. Identification: this step involved searching for scientific publications with PubMed and Google

Scholar. A total of 6,728 articles were retrieved, covering the period from 2010 through 2021. After the duplicates had been removed, only 5,168 articles remained.

2. Screening: the title and abstract screening resulted in removal of another 4,732 articles, leaving a selection of 436 articles. 11 articles were added from other sources (directly from journals such as «Eurosurveillance»), resulting in a total number of 447 articles provisionally selected for the review.
3. Eligibility: lacking full texts, another 57 articles were winnowed out; the remaining 383 articles were matched against the inclusion and exclusion criteria.
4. Final selection: in the final step, eight articles met the criteria and were selected for research synthesis and review.

In the latter, data on author names, publication dates, location, subject numbers, age range, gender, surveillance and intervention period, demographic distribution, geographical distribution, seasonal distribution were extracted.

No meta-analysis was performed, as the studies lacked methodological consistency, including target population, measurement variables, and statistical methods.

Quality Assessment

The quality of the studies was assessed against four categories of biases:

- 1) selection bias;
- 2) detection bias;

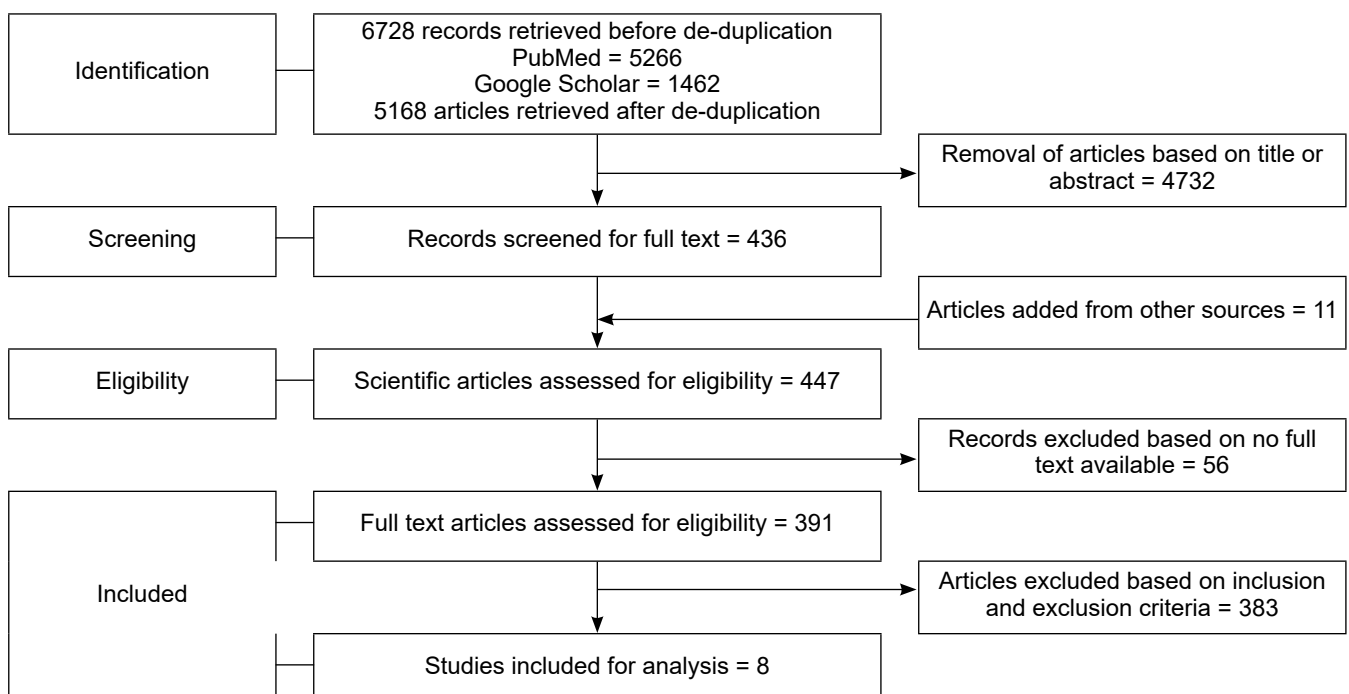


Fig. 1. Flow Diagram — Study Selection.

- 3) attribution bias;
- 4) reporting bias.

The studies were assessed using a 7 point-rating scale. The points were given to the studies according to the requirements of quality assessment. **Table 1** shows the complete list of categories and scores.

Results

Characteristics of studies

The fundamental characteristics of the studies are presented in **Table 2**. Out of 8 selected studies, 1 was conducted in England and Wales [12], 1 in Germany [13], 1 in Australia [14], 1 in Israel [15], 1 in the United States [16], 1 in Denmark [17], 1 in New Zealand [18], and 1 in Ireland [19]. In all the studies, the gender referred to males and females. However, age groups varied from study to study. In England and Wales, the age range was 0–100 years [12], in Germany, the age range was 0–70+ years [13], in Australia, the age range was 0–80 years [14], in Israel, the age range was 0–65+ years [15], in the United States, the age range was 0–60+ years [16], in Denmark, the age range was 0–90 years [17], in New Zealand, the age range was 0–15 years [18], and in Ireland, the age range was 0–65+ years [19].

All the cases analysed in the studies were laboratory confirmed. The researchers from England and

Table 1. Study quality assessment criteria

Quality assessment criteria		
Category	Sub-category	Score points
Selection bias	Methods of the study	0 = Unclear 1 = Partially clear 2 = Appropriately clear
Detection bias	Outcome assessment	0 = Unclear 1 = Partially clear 2 = Appropriately clear
Attribution bias	Outcome data	0 = Unclear 1 = Partially clear 2 = Appropriately clear
Reporting bias	Selective reporting	0 = Outcome measure reported without explanation 1 = Outcome measure reported with explanation

Wales [12], USA [16], New Zealand [18], and Ireland [19] used national data sets to collect the data on *Campylobacter* cases for interventions, while researchers from Germany [13], Australia [14], Israel [15], and Denmark [17] collected the data from national centres for disease control. The data ranged widely by their epidemiologic focus. However, collectively, the studies covered the age, gender, geographic location, and season. Some studies also presented data on ethnicity, hospitalizations, travel-related infections, deprivation index, and clinical details.

Table 2. Summary of the main characteristics of included studies and their respective quality assessment scores

Study	Location	Period	Age	Sex	Case validation	Source of information	Case distribution	Study quality
G.L. Nichols <i>et al.</i> , 2012 [12]	England and Wales	1989–2009	0–100 years	Male, female	Laboratory confirmed	National Diagnostic Laboratories (Oracle database)	Ethnic origin, postcode, deprivation index, population density	7
A. Schielke <i>et al.</i> , 2014 [13]	Germany	2001–2010	0–70+ years	Male, female	Laboratory confirmed	Robert Koch Institute (Federal Public Health Institute)	Age, sex, residence, hospitalisation, district of exposure, detected <i>Campylobacter</i> species	7
C.R. Moffat <i>et al.</i> , 2016 [14]	Australia	1998–2013	0–80 years	Male, female	Laboratory confirmed	Communicable Disease Network of Australia	Gender, age, season, states and territory	5
R. Bassal <i>et al.</i> , 2016 [15]	Israel	1999–2012	0–65+	Male, female	Laboratory confirmed	Israel Center of Disease Control	Age, gender, population group	6
A.L. Geissler <i>et al.</i> , 2017 [16]	USA	2004–2012	0–60+	Male, female	Laboratory confirmed	National Notifiable Disease Surveillance, National Outbreak Reporting System, National Antimicrobial Resistance Monitoring System, FoodNet	Age, race, ethnicity, sex, months, residence	7
K.G. Kuhn <i>et al.</i> , 2017 [17]	Denmark	2000–2015	0–90	Male, female	Laboratory confirmed	Danish National Institute of Infections Disease Control	Birth, sex, address, municipality, region of residence	7
E. Jeffs <i>et al.</i> , 2018 [18]	New Zealand	1997–2016	0–15	Male, female	Laboratory confirmed	National Minimum Dataset and the ESR Notifiable Disease Database	Age, sex, ethnicity, hospitalisation, report date, onset date, case status, clinical details	6
L. O'Connor <i>et al.</i> , 2020 [19]	Ireland	2004–2016	0–65+	Male, female	Laboratory confirmed	Computerised Infection Disease Reporting	Age, sex, geographical area, season	7

Epidemiologic characteristics of *Campylobacter*

The gender, age and geographic distribution of *Campylobacter* incidence, the relationship between the case rates and seasons, and the epidemiologic demography of cases from different countries are presented in **Table 3**.

Reported cases by country. From 1989 through 2009, a total number of 99,471 cases of *Campylobacter* infection were reported in England and Wales. In Germany, a total number of 588,308 cases of *Campylobacter* infection were recorded during 2001–2010. From 1998 through 2013, a total number of 245,023 *Campylobacter* infection cases were reported in Australia. In Israel, 40,978 *Campylobacter* infection cases were documented from 1999 through 2012. During 2004–2012, 303,520 campylobacteriosis cases were reported in the United States. In Denmark, 60,725 cases of *Campylobacter* infection were recorded from 2000 through 2015. From 1997 through 2016, New Zealand reported 39,970 cases of *Campylobacter* infection. In Ireland, there were 27,034 cases of *Campylobacter* infection reported from 2004 through 2016.

***Campylobacter* classification.** Four studies [12, 13, 15, 16] mentioned the type of *Campylobacter* that had caused outbreaks in the countries, while such data were not available in the other 4 studies [14, 17–19]. In

England and Wales, Israel, and the United States, the *Campylobacter* species that caused the outbreaks were identified as *C. jejuni* and *C. coli*. In Germany, the outbreaks were caused by *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, and *C. upsaliensis*.

Gender distribution. All the studies show that males have higher incidence rates of *Campylobacter* infection than females. However, the incidence rates varied widely across countries, time periods, and studies. In England and Wales, during 1989–2009, there were 14% more reported cases of infection in males than in females with an incidence rate ratio of 1.14. In Germany, from 2001 through 2010, the mean incidence was higher in men (96/100,000 population) than in women (83/100,000 population) with an incidence rate ratio of 1.15. In contrast to other age groups, among the 20–29-year-olds, women demonstrated higher incidence (113/100,000 population) compared to men (101/100,000). In Australia, from 1998 through 2013, the incidence was 20% higher among men than among women, with an incidence rate ratio of 1.20. For the 1999–2012 period, no Israeli data on incidence rate ratios were found; however, there were data that men accounted for 56.1% of all infection cases, while women comprised 43.9%.

In the United States, during 2004–2012, men and women accounted for 54.78% and 45.22% of all re-

Table 3. Summary of epidemiologic demography, *Campylobacter* species, campylobacter infections distribution in age, gender with geography and season

Study	Location	Period	Number of reported cases	<i>Campylobacter</i> type	Gender distribution	Age distribution	Geographical distribution	Seasonal distribution
G.L. Nichols <i>et al.</i> , 2012 [12]	England and Wales	1989–2009	99,471	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Higher incidence rate in men	Higher incidence rate in age group (50+ years)	Higher incidence rate in rural area	May–June
A. Schielke <i>et al.</i> , 2014 [13]	Germany	2001–2010	588,308	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari/fetus</i> / <i>upsaliensis</i>	Higher incidence rate in men, except age group 20–29	Higher incidence rate in age group (0–4 years)	Higher incidence rate in urban area	May–July
C.R. Moffat <i>et al.</i> , 2016 [14]	Australia	1998–2013	245,023	No information provided	Higher incidence rate in men	Ibid	Incidence rate varied state to state	September–February
R. Bassal <i>et al.</i> , 2016 [15]	Israel	1999–2012	40,978	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Ibid	Ibid	No information provided	April–August
A.L. Geissler <i>et al.</i> , 2017 [16]	USA	2004–2012	303,520	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Ibid	Ibid	Higher incidence rate in rural and non-metropolitan areas	June–August
K.G. Kuhn <i>et al.</i> , 2017 [17]	Denmark	2000–2015	60,725	No information provided	Ibid	Higher incidence rate in age groups (0–4; 20–24; 25–29 years)	Higher incidence rate in urban and intermediate areas	May–October
E. Jeffs <i>et al.</i> , 2018 [18]	New Zealand	1997–2016	39,970	No information provided	Ibid	Higher incidence rate in age group (0–4 years)	Incidence rate varied region to region	December–January
L. O'Connor <i>et al.</i> , 2020 [19]	Ireland	2004–2016	27,034	No information provided	Ibid	Ibid	Higher incidence rate in rural areas	April–May

ported cases of *Campylobacter* infection, respectively, with an incidence rate ratio of 1.25. In Denmark, during 2000–2015, the incidence among men was 73.2 cases per 100,000 population, while the incidence among women was 64.5 cases per 100,000 population, with an incidence rate ratio of 1.14. In Ireland, from 2004 through 2012, 53.4% and 46.7% of all *Campylobacter* cases were recorded in men and in women, respectively, with an incidence rate ratio of 1.15. Only in New Zealand, during 1997–2016, gender differences in the incidence were insignificant, with 51% and 49% of all *Campylobacter* cases reported in men and women, respectively.

Age distribution. In England and Wales, from 1989 through 2009, higher numbers of *Campylobacter* cases were reported among young adults (under 40 years) living in London. However, starting from 2000, the downward trend was observed in the number of *Campylobacter* cases in the 0–4-year-old age group. Nevertheless, all factors considered, the age-specific incidence rates were highest among senior citizens. In Germany, from 2001 through 2010, the *Campylobacter* incidence was highest among children from 0 to 4 years old compared to all other age groups (123/100,000 and 69/100,000, respectively). Interestingly, a high incidence was also recorded in the 20–29-year-old age group (107/100,000) compared to all other age groups (69/100,000).

In Australia, from 1998 through 2013, the highest age-specific incidence rates of *Campylobacter* infection were observed in the 1–4-year-old age group, both in males and females (254.5/100,000 and 204.2/100,000, respectively). Overall, the lowest incidence was reported among females aged 10–19 years. In Israel, from 1999 through 2012, the increase in *Campylobacter* incidence was observed in all age ranges. Nevertheless, the 0–4-year-old age group was reported as most affected (394.6/100,000) compared to other age groups.

In the United States, from 2004 through 2012, the highest incidence rates of *Campylobacter* infection were recorded among children aged 0–4 years (26.3/100,000). In the meantime, three states (Alaska, Connecticut, and Maine) reported the highest incidence rates among people aged ≥ 60 years. Overall, in all the states, the lowest incidence rates of *Campylobacter* infection were observed among the 10–19-year-old age group. However, the incidence rates increased among all age groups from 2004–2006 through 2010–2012, senior citizens aged ≥ 60 years being most affected.

In Denmark, from 2000 through 2015, significantly higher *Campylobacter* incidence was reported in 3 age groups: 20–24-year-olds (136/100,000), 25–29-year-olds (114/100,000), and 0–4-year-olds (96.8/100,000). In New Zealand, from 1997 through 2016, the most affected age group was that of 0–4-year-olds. From 1997 through 2007, the *Campylobacter* incidence among 0–4-year-old age group was 417 cases per 100,000

population, while 248 cases per 100,000 population were recorded in the same age group between 2008 and 2016. In Ireland, from 2004 through 2016, the highest *Campylobacter* incidence was reported in the 0–4-year-old age group (152/100,000).

Geographical distribution. From 1898 through 2009, in England and Wales, the study used postcodes to identify the geographic distribution of campylobacter cases. Cases of *Campylobacter* per 100,000 population were higher in areas of low population density (rural) compared to areas of high population density (urban). Note that less postcode reporting in areas of high population density could introduce some bias; however, the subset analysis of areas with over 90% postcode reporting showed higher incidence in rural settings.

From 2001 through 2012, in Germany, the incidence in rural settings was 69/100,000 population and in urban areas — 73/100,000 population. Children living in rural regions were more frequently affected by *Campylobacter* infection than children living in urban areas, which is especially obvious in the age group of <10 years (130/100,000 and 83/100,000). On the contrary, the incidence among 20–69-year-olds living in urban settings was higher than among their peers living in rural settings (77/100,000 and 64/100,000, respectively). In addition, the incidence of *Campylobacter* infection was higher in the eastern German federal states than in the western German federal states.

In Australia, from 1998 through 2013, the geographical distribution was analysed state-by-state rather than by urban/rural area of residence. Over the observed period, the *Campylobacter* incidence rates varied from state to state. The highest incidence (177.5/100,000 and 172.2/100,000) was reported in South Australia in 2001 and 2012; the lowest incidence (69.2/100,000 and 66.7/100,000) was reported in Victoria in 1998 and 2011.

In the United States, the *Campylobacter* incidence was higher in rural areas (14.2/100,000) compared to urban areas (11/100,000). In addition, the study also reported the following geographical areas: the West, the Northwest, the Midwest, and the South. In the West, the *Campylobacter* incidence rates were highest (16.2/100,000), while in the Northwest, the incidence rates were lower (13.3/100,000) as compared to the rates reported in the West. However, the lowest incidence rates were reported in the South (6.8/100,000) and in the Midwest (13/100,000).

The study from Israel did not provide any data on geographical distribution. In Denmark, during 2000–2015, the country was divided into four zones designated as urban, intermediate, distant, and rural. Overall, the highest *Campylobacter* incidence was recorded in intermediate areas (106.4/100,000) and urban settings (61.2/100,000). Furthermore, the *Campylobacter* incidence in the 0–4-year-old age group was higher in distant areas (142/100,000) and in rural areas

(225.6/100,000). On the contrary, the *Campylobacter* incidence in the age group 50+ years was higher in intermediate areas (106.4/100,000) and urban areas (149.5/100,000).

From 1997 through 2016, in New Zealand, the study mentioned the relationship between the *Campylobacter* incidence and geographical locations, though it did not provide any explanatory information about the distribution. Yet, the study mentioned that the highest incidence was recorded in South Canterbury with an incidence rate ratio of 1.77. In Ireland, during 2004–2016, no data on incidence in rural or urban areas were available; however, the highest *Campylobacter* incidence (58.7/100,000 population) was reported in the Midlands (a rural area).

Seasonal Distribution. In England and Wales, from 1989 through 2009, the *Campylobacter* incidence tended to peak in summer. The increased rate of infection between week 18 (early May) and week 22 (early June) is consistently reported every year. In Germany, from 2001 through 2010, the *Campylobacter* incidence increased from May to July and peaked in August. However, a small peak in the monthly incidence was also recorded in January.

During 1998–2013, in Australia, the *Campylobacter* incidence demonstrated similar rates in winter and autumn, while the highest incidence was recorded in spring and summer, with incidence rate ratios of 1.18, and 1.17, respectively. In Israel, from 1999 through 2012, the incidence was reported to peak from April through August.

In the United States, from 2004 through 2012, the highest *Campylobacter* incidence rates were reported during June–August and the lowest rates were observed during December–January. Interestingly, a small peak in the incidence was observed in January in the age group <30 years. In Denmark, the highest *Campylobacter* incidence rates were recorded during May–October, with a peak in August during 2000–2015.

In New Zealand, from 1997 through 2016, the highest *Campylobacter* incidence rates were recorded during summer months from December through February. In Ireland, a sharp increase in the *Campylobacter* incidence was observed in summer, during April–May, reaching a peak in August. The univariate analysis showed the incidence rate ratio of 1.57 in spring and incidence rate ratios of 1.45 and 1.09 in summer and autumn, respectively.

Discussion

The systematic review presents the analysis of 8 studies. It has been found that epidemiologic characteristics of *Campylobacter* infections vary from country to country and depend on various factors such as age, gender, season/weather, and geographical areas.

It has been found that *Campylobacter* incidence was higher among men compared to women in all eight

studies, except for the German 20–29-year-old age group where the incidence was higher among women than men. Although higher *Campylobacter* incidence rates among men still lack explanation, it can be assumed that there are factors that may contribute to increased susceptibility to *Campylobacter* infections among men compared to women. Among them, there are such factors as culture, sex hormones, behaviour, genetics, and gut microbiome [20–22]. Regarding possible cultural factors, in all the eight countries in this study, there is no evidence that the gender of a child has any influence on seeking for medical care for acute infections. Similarly, there is no evidence that adult men in these eight countries are more likely than women to seek medical care for acute infections, though there is some evidence that men tend to use health services less than women do [23]. One of the behaviour-related factors mentioned is that men are more likely to get *Campylobacter* infection as they tend to spend more time outdoors as compared to women [19]. However, sex hormones, genetics, and gut microbiome may also play a role in gender distribution of incidence, urging for further research.

In all 8 studies, the 0–4-year-old age group was most affected by the *Campylobacter* infection. High *Campylobacter* incidence rates reported among the 0–4-year-olds are not surprising and can be caused by multiple factors, including poor hygiene practices, higher chances of being clinically tested, having close contacts with pets or animals, and not having a strong immune system. However, these high incidence rates of *Campylobacter* infection among young children are in line with the epidemiology of other gastrointestinal infections showing a comparable age-specific pattern [13, 17]. In addition, in Denmark, 20–24 and 25–29-year-old age groups were also among the age groups most affected by *Campylobacter* infections. It may be associated with the fact that young adults leave home to pursue education or to work, and they may not follow basic food hygiene practices when learning how to cook for themselves [24].

Furthermore, in case of urban vs rural areas, higher incidence rates of *Campylobacter* infection were observed in rural areas. What causes such urban/rural difference in *Campylobacter* incidence rates remains unclear. The contributing factors may include proximity to ruminants and other farm animals or differences in access to healthcare [12]. On the contrary, in Denmark, higher numbers of *Campylobacter* cases were recorded in urban areas than in rural settings, and the reasons are still unclear.

Seasonal outbreaks of *Campylobacter* infection were mostly reported in spring and summer in all the countries. *Campylobacter* infection outbreaks in spring and summer can be explained by existence of favourable conditions for pathogens, which tend to thrive due to environmental and climate factors; *Campylobacter*

pathogens become more prevalent in poultry during warm seasons, causing an increase in *Campylobacter* incidence that reaches its peak in summer [25]. Other reasons that may be responsible for seasonal outbreaks include people's eating habits and hygiene practices. In addition, a small peak of *Campylobacter* incidence was reported in winter both in the United States and Germany. However, further research is needed to explain the relationship between this peak and the winter season.

Additionally, only three studies [12, 13, 17] discussed the relationship between travel and *Campylobacter* incidence, suggesting that surveillance systems need to concentrate on imported infection cases and their contribution to the local incidence. Imported cases should be given more focused attention, considering increasing antibiotic resistance of *Campylobacter* pathogens [26].

Conclusion

Undoubtedly, outbreaks of *Campylobacter* infection remain a serious public health concern in high-income countries. Different *Campylobacter* species affect age groups, genders, and locations (urban/rural) in different seasons of the year. Although there is treatment available for *Campylobacter* infection, the growing antibiotic and antimicrobial resistance of *Campylobacter* poses a serious threat. Based on the literature synthesis, it can be concluded that while *Campylobacter* infections are found in every age, gender, locality, their case rates are highest among very young or very old age groups, mostly men, living in rural areas, with incidence peaks in summer. While further research is required to understand the above patterns of *Campylobacter* incidence, there is also a need for promoting health education in prevention of such outbreaks in general population.

Strengths of the Study

The study thoroughly assessed the literature describing *Campylobacter* infection cases in different high-income countries during different periods. Epidemiologic characteristics of *Campylobacter* infection in humans are presented in relation to age, gender, area of residence, and season.

Limitations of the Study

The study was unable to synthesise the data on *Campylobacter* infection cases in terms of ethnicity, travel, mortality and morbidity, as only very few studies addressed such categories. Therefore, these aspects remained uncovered.

REFERENCES

1. Kirk M.D., Pires S.M., Black R.E., Caipo M., Crump J.A., Devleeschauwer B., et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Med.* 2015; 12(12): e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
2. Costa D., Iraola G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019; 32(4): e00072–18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00072-18>
3. Man S.M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 8(12): 669–85. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191>
4. Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28(3): 687–720. <https://doi.org/10.1128/cmr.00006-15>
5. Nielsen H., Hansen K.K., Gradel K.O., Kristensen B., Ejlersen T., Østergaard C., et al. Bacteraemia as a result of *Campylobacter* species: a population-based study of epidemiology and clinical risk factors. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1): 57–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02900.x>
6. Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28(3): 687–720. <https://doi.org/10.1128/cmr.00006-15>
7. Man S.M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 8(12): 669–85. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191>
8. Fitzgerald C. *Campylobacter*. *Clin. Lab. Med.* 2015; 35(2): 289–98. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001>
9. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., et al. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 7–15.
10. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 2017; 15(12): e05077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
11. Gastrointestinal Infections Department. *Campylobacter* data 2007 to 2016. London: Public Health England; 2018. Available at: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/796964/campylobacter_data_2007_to_2016_may_2018.pdf
12. Nichols G.L., Richardson J.F., Sheppard S.K., Lane C., Saran C. *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011. *BMJ Open.* 2012; 2(4): e001179. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001179>
13. Schielke A., Rosner B.M., Stark K. Epidemiology of campylobacteriosis in Germany – insights from 10 years of surveillance. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-30>
14. Moffatt C.R., Glass K., Stafford R., D'Este C., Kirk M.D. The campylobacteriosis conundrum – examining the incidence of infection with *Campylobacter* sp. in Australia, 1998-2013. *Epidemiol. Infect.* 2017; 145(4): 839–47. <https://doi.org/10.1017/s0950268816002909>
15. Bassal R., Lerner L., Valinsky L., Agmon V., Peled N., Block C., et al. Trends in the Epidemiology of Campylobacteriosis in Israel (1999–2012). *Foodborne Pathog. Dis.* 2016; 13(8): 448–55. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2096>
16. Geissler A.L., Bustos Carrillo F., Swanson K., Patrick M.E., Fullerton K.E., Bennett C., et al. Increasing *Campylobacter* infections, outbreaks, and antimicrobial resistance in the United States, 2004-2012. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(10): 1624–31. <https://doi.org/10.1093/cid/cix624>
17. Kuhn K.G., Nielsen E.M., Mølbak K., Ethelberg S. Epidemiology of campylobacteriosis in Denmark 2000-2015. *Zoonoses Public Health.* 2018; 65(1): 59–66. <https://doi.org/10.1111/zph.12367>
18. Jeffs E., Williman J., Martin N., Brunton C., Walls T. Epidemiology of *Campylobacter* gastroenteritis in New Zealand children

- and the effect of the *Campylobacter* strategy: A 20-year observational study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2019; 38(6): 569–76. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002228>
19. O'Connor L., McKeown P., Barrasa A., Garvey P. Epidemiology of campylobacter infections in Ireland 2004–2016: What has changed? *Zoonoses Public Health.* 2020; 67(4): 362–9. <https://doi.org/10.1111/zph.12695>
 20. Fish E.N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(9): 737–44. <https://doi.org/10.1038/nri2394>
 21. Klein S.L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000; 24(6): 627–38. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00027-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00027-0)
 22. Rizzetto L., Fava F., Tuohy K.M., Selmi C. Connecting the immune system, systemic chronic inflammation and the gut microbiome: the role of sex. *J. Autoimmun.* 2018; 92: 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.05.008>
 23. Bertakis K.D., Azari R., Helms L.J., Callahan E.J., Robbins J.A. Gender differences in the utilization of health care services. *J. Fam. Pract.* 2000; 49(2): 147–52.
 24. Simonsen J., Frisch M., Ethelberg S. Socioeconomic risk factors for bacterial gastrointestinal infections. *Epidemiology.* 2008; 19(2): 282–90. <https://doi.org/10.1097/ede.0b013e3181633c19>
 25. Williams M.S., Golden N.J., Ebel E.D., Crarey E.T., Tate H.P. Temporal patterns of *Campylobacter* contamination on chicken and their relationship to campylobacteriosis cases in the United States. *Int. J. Food Microbiol.* 2015; 208: 114–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.018>
 26. Shen Z., Wang Y., Zhang Q., Shen J. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0013-2017>

Information about the author

Gurkeerat Gill[✉], gurkeerat@ymail.com,
<https://orcid.org/0000-0003-2356-9964>

The article was submitted 29.06.2021;
accepted for publication 14.09.2021;
published 30.10.2021

ЮБИЛЕИ



Академик В.Д. Беляков — творец современной отечественной теории эпидемиологической науки: к столетию со дня рождения выдающегося учёного, педагога и военного эпидемиолога

Белов А.Б., Кузин А.А.✉, Зобов А.Е.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

В статье анализируются итоги жизнедеятельности и творческое наследие академика РАМН и РАЕН профессора генерал-майора медицинской службы Виталия Дмитриевича Белякова (1921–1996 гг.) в связи со 100-летием со дня его рождения и 85-летием образования кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. Выдающийся ученый-эпидемиолог, организатор и педагог в течение 18 лет возглавлял эту кафедру, а затем 14 лет руководил кафедрой эпидемиологии 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. За эти годы он создал две собственные эпидемиологические школы и внёс неоценимый вклад в эпидемиологическую науку, профессиональную подготовку кадров для военно-медицинской службы и здравоохранения страны, а также в совершенствование систем противозидемического обеспечения войск (флота) и профилактической медицины. Главные заслуги В.Д. Белякова и его учеников состоят в разработке теории саморегуляции паразитарных систем, признанной биологическим фундаментом эпидемиологии инфекционных заболеваний; внедрении в медицинских вузах преподавания основ эпидемиологии неинфекционных болезней и методологии эпидемиологической диагностики; обосновании современных систем эпидемиологического надзора за заболеваемостью населения и управления эпидемическим процессом актуальных инфекций. Он и его сотрудники внесли большой вклад в изучение и профилактику значимых для личного состава войск (флота) и населения инфекций; совершенствование иммуно- и экстренной профилактики; реформирование профилактических направлений системы высшего медицинского образования и структур здравоохранения.

Ключевые слова: академик В.Д. Беляков, история эпидемиологии, эпидемиологическая теория и практика, интеграция в эпидемиологической науке, медико-профилактическое образование

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: Белов А.Б., Кузин А.А., Зобов А.Е. Академик В.Д. Беляков — творец современной отечественной теории эпидемиологической науки: к столетию со дня рождения выдающегося учёного, педагога и военного эпидемиолога. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):597–607.

Виталий Дмитриевич Беляков, академик АМН СССР и РАЕН, доктор медицинских наук, профессор, генерал-майор медицинской службы, принадлежит к когорте замечательных отечественных ученых, посвятивших себя профилактической медицине и эпидемиологической науке. Его жизненный и творческий путь является примером благородного служения медицинской науке и деятельного участия в обучении и воспитании будущих врачей и специалистов-эпидемиологов медицинской службы Вооруженных сил и здравоохранения страны [1–3]. 10 ноября 2021 г. научно-педагогическое сообщество профилактического здравоохранения и воен-

ной медицины будет отмечать исторические даты — 100-летие со дня рождения академика В.Д. Белякова и 85-летие образования кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (ВМедА). Такое хронологическое совпадение свидетельствует о неразделимости судьбы Виталия Дмитриевича и кафедры академии, которую он возглавлял 18 лет. Более 34 лет жизни Виталия Дмитриевича были связаны сначала с его учебной, а затем научно-исследовательской и педагогической деятельностью в *Alma mater*.

Виталий Дмитриевич родился в деревне Юрцино Ивановской области, с отличием окончил среднюю школу, в 1938 г. поступил в ВМедА и учился в ней вплоть до ноября 1941 г., преодолевая, как и все



её слушатели, тяготы начавшейся войны и блокады Ленинграда. Завершал ускоренный курс обучения он в Самарканде, куда эвакуировали академию осенью 1941 г. Нужно отметить, что в период учебы слушатель В.Д. Беляков был сталинским стипендиатом, награжденным знаком «Отличник РККА». В мае 1942 г. он окончил академию и во время Великой Отечественной войны служил на должностях войсковых врачей частей и соединений. В послевоенное время он продолжил работать в системе медицинской службы погранвойск, в том числе в должности врача-бактериолога, а затем начальника санитарно-эпидемиологической лаборатории. В апреле 1952 г. В.Д. Беляков поступил в адъюнктуру ВМедА при кафедре эпидемиологии с дезинфекцией, которую окончил досрочно в 1954 г., защитил кандидатскую диссертацию и был оставлен на преподавательской работе.

Учителями Виталия Дмитриевича были видные ученые-эпидемиологи профессора Г.А. Знаменский и И.И. Рогозин (член-корреспондент АМН СССР) — последователи основателя кафедры профессора Д.К. Заболотного. Они известны как выдающиеся организаторы противоэпидемической службы войск, лично участвовавшие в борьбе с эпидемиями опасных инфекций в войсках и среди населения в период Великой Отечественной войны. Также Виталий Дмитриевич считал своими наставниками профессоров В.А. Башенина (питомца ВМедА, возглавлявшего Ленинградскую эпидемиологическую школу), и Л.В. Громашевского, с которым переписывался и встречался. На кафедре эпидемиологии ВМедА был опытный научно-педагогический состав: профессора А.Л. Сироко, Б.Л. Шура-Бура, преподаватели Н.И. Вальвачев, Р.А. Тарарин, Р.Х. Яфаев и др.; многие имели опыт противоэпидемической работы в условиях боевых действий. Под руководством упомянутых учителей Виталий Дмитриевич менее чем за 10 лет, благода-

ря своему опыту, интеллекту, талантам и работоспособности, сформировался как крупный ученый и педагог, руководитель одной из ведущих кафедр профилактической медицины ВМедА и страны. Об этом свидетельствует его быстрое восхождение по «служебной лестнице»: он за 5 лет прошёл путь от младшего до старшего преподавателя, а в 1959 г. ему было присвоено учёное звание доцента. В 1963 г. он защитил докторскую диссертацию, в 1964 г. был назначен начальником кафедры общей и военной эпидемиологии, а в 1965 г. ему было присуждено учёное звание «профессор». Его заслуги в науке были тоже высоко оценены: в 1971 г. В.Д. Беляков был избран членом-корреспондентом, в 1978 г. — действительным членом АМН СССР, а в 1979 г. ему было присвоено воинское звание «генерал-майор медицинской службы» (выше штатной должностной ступени за выдающиеся заслуги в военной эпидемиологии).

Основная обязанность Виталия Дмитриевича как начальника кафедры заключалась в общем руководстве учебно-методической работой и научными исследованиями сотрудников. Организация учебного процесса и методической работы преподавателей в 1970–1980-е гг. осуществлялась заместителем начальника кафедры опытным доцентом Б.А. Кожевниковым, а стратегические вопросы всегда решал руководитель. Научную деятельность коллектива Виталий Дмитриевич курировал лично. Он считал обязательным для учёного быть в курсе достижений в области всей инфектологии, а не только своей специальности. Ветераны кафедры свидетельствуют, что он систематически просматривал литературу по широкому спектру дисциплин помимо эпидемиологии. Считая, что открытия делаются на стыках наук, он проявлял особое внимание к достижениям микробиологии, иммунологии, паразитологии, вакцинологии. В круг его интересов входили также вопросы, связанные с клиническими аспектами инфекционных болезней, биологией, генетикой, ветеринарией, философией.

Он лично занимался подготовкой учебников и учебных пособий; монографий, материалов в журналы и докладов на конференциях и сборах специалистов, а также рецензированием научных трудов, диссертаций и т.п. При этом Виталий Дмитриевич часто привлекал к сотрудничеству не только крупных учёных, но и своих непосредственных учеников: это можно увидеть в перечне соавторов его основных трудов. Кроме того, он продуктивно работал в различных научных и образовательных комиссиях, прежде всего в системе АМН СССР (а позже и РАЕН), что отражают его актовые речи, доклады и публикации. Ему также приходилось многократно участвовать в ответственных мероприятиях в ВМедА и военных округах по плану Главного военно-медицинского управления Мини-

ЮБИЛЕИ

стерства обороны СССР и выезжать за границу на симпозиумы и конференции с научными докладами и лекциями. По свидетельству тех, кому довелось их слушать, он был замечательным лектором и считал своим долгом читать основополагающие лекции слушателям всех факультетов ВМедА. Создавая свою научно-педагогическую школу, он тщательно отбирал учеников и в интересах дела и реализации своих планов умело использовал лучшие качества исполнителей заданий.

Виталий Дмитриевич с начала своей деятельности в ВМедА огромное внимание, наряду со своими диссертационными исследованиями и служебными обязанностями, уделял теоретическим изысканиям в области общей эпидемиологии. Важнейшим этапом в его становлении как серьёзного ученого стала работа над монографией «Эпидемический процесс. Теория и метод изучения» (1964). Ее появление было следствием опыта, приобретённого автором при подготовке нескольких учебников и учебно-методических пособий, статей в сборники, а также монографий, в том числе в соавторстве с профессором И.И. Рогозиным [4–6]. В упомянутом труде с позиции критического анализа становления отечественной эпидемиологии им был намечен путь к пересмотру некоторых устаревших и противоречивых теоретических воззрений. С этого времени он начал упорно реализовывать идею обновления структуры и содержания теории эпидемиологии инфекционных заболеваний (учения об эпидемическом процессе), соответствующих современным достижениям медико-биологической науки. Он шёл к этой цели последовательно и поэтапно, сопоставляя параллели и тенденции развития эпидемиологии в мире и стране, значительно опережая свое время.

Основы отечественной эпидемиологии, как известно, были разработаны создателем первой научной теории эпидемического процесса выдающимся ученым-эпидемиологом Л.В. Громашевским. Её законы и положения до 1970-х гг. служили основанием практических рекомендаций по организации профилактических и противоэпидемических мероприятий в очагах инфекционных заболеваний среди населения и военнослужащих. Основные закономерности эпидемиологической парадигмы, объединившей эту теорию и разработки академиков И.И. Елкина, В.М. Жданова, В.Н. Беклемишева и других крупных ученых, основывались на ряде господствующих тогда в инфектологии положений. К ним относили: постоянство паразитических и патогенных признаков возбудителя при односторонней зависимости от них восприимчивости людей; основной закон паразитизма и «элементарную ячейку» эпидемического процесса как её внутреннюю причину; закон соответствия эпидемиологической локализации возбудителей в организме хо-

зяина; заносной генез заболеваемости населения и формирования эпидемических очагов инфекций. Из этого вытекал приоритет в практике борьбы с инфекционной заболеваемостью — предупреждение заражения людей и локализация (ликвидация) эпидемических очагов воздействием на пути и факторы передачи возбудителей инфекций.

Сегодня очевидно, что уровень эпидемиологической науки первой половины XX в. еще не позволял диалектически решить вопрос причинности эпидемического процесса, считавшегося тогда предметом данной дисциплины, ориентированной только на инфекционную патологию. Иммунология и вирусология были в начале своего становления, бактериология ещё не достигла высот, а вакцинология только добилась первых успехов в профилактике отдельных опасных инфекций. Степень развития эпидемиологической и этиологической диагностики заболеваемости ещё была недостаточной для формирования полноценной системы эпидемиологического надзора и прогнозирования заболеваемости. Существующие противоречия учения Л.В. Громашевского некоторым теоретическим концепциям и категориям смежных дисциплин, особенно биологии и паразитологии, усложняли практику борьбы с инфекциями. К тому же в стране в послевоенное время, особенно в 1960–1970-е гг., постепенно стали ощущаться признаки нарастающего кризиса в здравоохранении из-за недостаточной эффективности профилактической медицины. Одним из тех учёных, кто первым оценил и понял необходимость ревизии теории и перестройки практической эпидемиологии, был В.Д. Беляков.

Свои идеи и предложения он опубликовал в учебнике «Военная эпидемиология» (1976), в котором предложил первую научно обоснованную структуру теории эпидемического процесса, состоящую из трех взаимосвязанных разделов. Их содержание, безусловно, стало шагом вперед по сравнению с устаревающей концепцией Л.В. Громашевского [7]. В представленных теоретических разработках В.Д. Беляков первым из эпидемиологов использовал методологию популяционно-экологического и структурного подхода. Кроме того, он привел доказательства ведущей роли в эпидемическом процессе антропонозов функционирования внутренних резервуаров возбудителей в организованных (в том числе воинских) коллективах, что раньше отрицалось. В учебнике он с диалектических позиций рассматривает эпидемический процесс как взаимодействие неоднородных по патогенности видов паразитов и их хозяев по восприимчивости в изменчивых социальных и природных условиях. С тех пор новое представление о закономерностях эпидемического процесса он стал уточнять и внедрять в эпидемиологическую науку и преподавание.

Виталий Дмитриевич развил идеи академика Е.Н. Павловского о природе паразитизма в биоло-

гии и медицине и творчески использовал их в эпидемиологии. Его вклад в обоснование сущности полипатогенности (полигастральности или многохозяинности) и политропности возбудителей зоонозов (зооантропонозов) и сапронозов в организмах животных и человека способствовал совершенствованию систематики этих болезней в медицине. Ему удалось рационально дифференцировать зоонозы на трансмиссивные (облигатные и факультативные) и нетрансмиссивные инфекции с множественным (комбинированным) механизмом передачи. Механизмы передачи их возбудителей он рассматривал только применительно к соответствующим резервуарам, а пути и факторы передачи человеку и животным — как частное от этих категорий и общее для любых теплокровных организмов. Поэтому его классификация инфекционных болезней человека по механизмам передачи возбудителей была более обоснованной с экологических позиций, чем антропоцентристские предложения последователей Л.В. Громашевского, смешивающих эти понятия. Виталий Дмитриевич первым ввёл в преподавание подраздел «Сапронозы (сапрозоонозы)» — об инфекциях, описанных профессором В.И. Терских, достижение которого долго не признавалось или замалчивалось. В дальнейшем академик участвовал в развитии этой приоритетной для страны концепции, сотрудничая с московскими учеными [7–11]. Все эти новые положения были включены в его учебник, который надолго стал настольной книгой многих военных и гражданских эпидемиологов и руководством в практике.

В упомянутом издании впервые появился раздел преподавания эпидемиологической диагностики инфекционной заболеваемости, методически разработанный под руководством В.Д. Белякова его учениками А.П. Ходыревым и А.А. Дегтяревым. Эпидемиологический анализ и прогнозирование эпидемического процесса становились основой для развивающейся системы эпидемиологического надзора в стране и стратегией борьбы с инфекционной заболеваемостью. Среди научных проблем эпидемиологии и смежных с ней дисциплин Виталий Дмитриевич особое внимание уделял вопросам иммунопрофилактики, в том числе ассоциированной иммунизации. Его кандидатская и докторская диссертации были посвящены вакцинации против дизентерии и связаны с эпидемиологическими, бактериологическими и иммунологическими исследованиями. В годы безмерной уверенности в могущественности иммунопрофилактики на фоне успешного массового применения первых вакцин, благодаря его исследованиям, удалось изъять из состава дизентерийной поливакцины малоэффективные и реактогенные компоненты, обосновать и ввести в действие новый календарь прививок личному составу Вооружённых сил СССР. Вопросам

иммунопрофилактики были посвящены совместные с И.И. Rogozinym и Р.Х. Яфаевым монографии, в которых он проявляет глубокие знания в вопросах смежных дисциплин [12, 13].

Под руководством Виталия Дмитриевича ежегодно на кафедре проводились исследования по 50–60 темам научно-исследовательских работ, основной целью которых было совершенствование деятельности медицинской службы по профилактике инфекционной заболеваемости в войсках. Большой вклад коллектив кафедры внес в изучение актуальных для войск (сил флота) проблем частной эпидемиологии (ангина, дифтерия, грипп и ОРВИ, холера, вирусные гепатиты, менингококковая и острые кишечные инфекции, актуальные зоонозы и сапронозы). Совместно с другими учреждениями испытывались образцы обмывочно-дезинфекционной техники, средства обеззараживания, дезинсекции и дератизации, иммуно- и экстренной профилактики, безыгольные инъекторы, иммуностимуляторы и др. На основе результатов этих работ разрабатывались и распространялись инструктивно-методические указания для медицинской службы Вооружённых сил по соответствующим темам. Многие из них неоднократно обновлялись и переиздавались, а их исполнители представляли материалы работы на различных научных мероприятиях и сборах медицинского состава армии и флота, успешно защищали кандидатские и докторские диссертации.

В.Д. Беляков первым в стране научно обосновал необходимость углублённого эпидемиологического изучения проблемы внутрибольничных инфекций, накладывающих огромное бремя на здравоохранение, настаивал на введении в штаты крупных лечебных учреждений госпитальных эпидемиологов. В дальнейшем эти идеи были реализованы, и в этой сфере профилактической медицины обозначились успехи. Высокую оценку специалистов получили результаты комплексных исследований клинико-эпидемиологических проявлений стрептококковых и стафилококковых инфекций с применением системного и этиологического подходов. Эти материалы были представлены в двух фундаментальных монографиях, написанных В.Д. Беляковым в сотрудничестве с известными учёными — микробиологом А.А. Тотоляном и хирургами ВМедА академиком А.П. Колесовым и В.И. Немченко, а также преподавателями кафедры А.П. Ходыревым и П.Б. Остроумовым [14, 15]. Эксперты ВОЗ одобрили эту методологию и рекомендовали шире использовать её в эпидемиологических исследованиях при полисиндромных моноэтиологических нозологиях. Можно констатировать, что благодаря инициативе академика В.Д. Белякова сегодня успешно развивается новое направление в научной и практической эпидемиологии по профилактике инфекций, связанных с медицинской помощью населению. Кроме пе-

ЮБИЛЕИ

речисленного, велись научные разработки по совершенствованию структуры, функций и организации работы санитарно-эпидемиологических учреждений в мирное и военное время, методологии оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости военнослужащих, методов оценки эффективности противозидемических мероприятий. Многие рекомендации были внедрены в практическую деятельность медицинской службы Вооружённых сил: ими специалисты руководствуются и в настоящее время.

Анализируя итоги многогранной деятельности В.Д. Белякова, можно заметить, что все идеи, которые он вынашивал, имели системную философскую и эволюционно-экологическую основу, нередко подпитывали друг друга, а их реализация подчинялась генеральному замыслу — созданию профилактической науки будущего. Этот стиль применялся им также в управлении учебно-методической и научно-исследовательской работой на кафедре: он отражал умение руководителя стратегически мыслить и решать задачи комплексно, системно, всегда выделяя главное. По свидетельству ветеранов двух кафедр, которые последовательно возглавлял академик Беляков, Виталий Дмитриевич обладал огромной работоспособностью и трудился над учебниками и другими материалами даже в отпуске. У него невероятно была развита способность аналитического мышления, благодаря которому он улавливал всё новое и прогрессивное и старался внедрить это в работу кафедры. Он считал, что открытия делаются в основном большими коллективами на междисциплинарных уровнях и укреплял связи с различными научно-исследовательскими организациями города и страны.

В конце 1960-х гг. под его руководством начались уникальные многолетние комплексные наблюдения и эпидемиологические эксперименты на моделях этиологически верифицированной заболеваемости воздушно-капельными инфекциями в воинских коллективах. Были изучены структура и многолетняя динамика заболеваемости и факторов иммунорезистентности военнослужащих; клинико-эпидемиологическая характеристика заболеваний у лиц разного риска повторных случаев, в частности, гриппа и ОРВИ; апробировались тесты для выявления лиц с дисбалансом иммунитета; применялись различные подходы к иммуно- и экстренной профилактике, новые вакцины и химиопрепараты, в том числе внедрённые позже в практику, и т.д. Главным же итогом десятилетней и последующей работы кафедры и привлечённых научных организаций города стала разработка В.Д. Беляковым и соавторами теории внутренней регуляции (саморегуляции) эпидемического процесса.

Окончательное признание явления внутренней регуляции эпидемического процесса открытием в

медицине произошло в 1986 г. после регистрации в реестре открытий и изобретений СССР. Соавторами многолетнего труда являлись ученики В.Д. Белякова и сотрудники кафедры П.Б. Остроумов, А.А. Селиванов, А.П. Ходырев, К.Г. Иванов — организаторы исследований кафедрального коллектива по упомянутой тематике. В окончательном виде открытие получило название «саморегуляция паразитарных систем» в известной одноименной монографии, написанной В.Д. Беляковым в соавторстве с Д.Б. Голубевым, Г.Д. Каминским и В.В. Тец [16–18]. Основные положения этой концепции преподавались на кафедре ВМедА еще с конца 1970-х гг., а именно: новое диалектическое представление об эпидемическом процессе и его формулировка; характеристика фаз процесса и его эпидемических проявлений; механизмы регуляции природными и социальными условиями взаимодействия гено- и фенотипически гетерогенных возбудителей инфекций и биологических хозяев по сопряжённым признакам; методология оценки и прогнозирования заболеваемости, а также выявления предрасположенных к частым заболеваниям лиц и их превентивной защиты и т.д. Эти закономерности новой теории за период прохождения заявки на открытие были подтверждены исследованиями, проведёнными в других учреждениях страны (в том числе специалистами немедицинского профиля) не только на моделях различных антропонозных инфекций, но и при зоонозах и сапронозах.

Параллельно развернулись идейная борьба и полемика в научных кругах между сторонниками и противниками концепции, имеющей признаки новой теоретической парадигмы эпидемиологии инфекционных болезней человека. Однако эти дискуссии проходили уже в иной период деятельности В.Д. Белякова (с 1982 по 1996 г.), поскольку он после выхода в отставку был избран заведующим кафедрой эпидемиологии (ныне кафедра эпидемиологии и доказательной медицины) 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. Следует пояснить, что о достижениях Виталия Дмитриевича и коллектива этой кафедры, а также реализации его замыслов полнее могут сообщить московские ученики и последователи академика И.И. Елкина и В.Д. Белякова. Они лучше нас знают историю и вклад своих учителей в её деятельность и корректно сопоставят два исторических периода её существования. Наша задача — лишь для полноты оценки целенаправленной жизнедеятельности Виталия Дмитриевича совместить оба периода, используя свидетельства московских коллег. Мы хотим отметить преемственность идей и замыслов академика, которые он годами прорабатывал и в итоге реализовал в научной, профилактической и образовательной практике, независимо от места жительства и работы. Поэтому кратко перечислим в

рамках общего контекста статьи наиболее важные, с нашей точки зрения, достижения академика и коллектива, который он возглавил в 1982 г.

По свидетельству сотрудников кафедры, он существенно переформатировал научную деятельность профессорско-преподавательского состава. Изучение особенностей саморегуляции паразитарных систем при различных инфекциях продолжилось в новых условиях, причём с использованием самых современных методов исследования, в том числе молекулярно-биологических. Были вскрыты механизмы симбиотических отношений популяций различных бактерий с людьми из коллективов риска; изучены прямые и обратные, положительные и отрицательные связи процессов управления в паразитарных системах на генетическом уровне и участие в них социальных и природных регуляторов; определена роль лиц с иммунологическим дисбалансом в резервации эпидемических «штаммов» (клонов). Эта напряжённая работа коллектива проходила на фоне продолжающейся полемики по теории саморегуляции, которая была особенно бескомпромиссной 23 мая 1986 г. на заседании бюро Научного совета по эпидемиологии, паразитологии и инфекционным заболеваниям АМН СССР и президиума Всесоюзного научного общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов им. И.И. Мечникова [17]. Дискуссия явила полемический талант Виталия Дмитриевича и стала хрестоматийной, как и его лекции, статьи в журналах и доклады по данной теме.

Параллельно Виталий Дмитриевич совершенствовал теоретическое обоснование своей концепции и варианты ее применения в практике эпидемиологического надзора. Для этого на кафедре была создана лаборатория научных основ управления эпидемическим процессом, на которую Государственный комитет по науке и технике возложил задание по разработке критериев ликвидации управляемых инфекционных заболеваний (корь, дифтерия, полиомиелит и др.). В выполнении ряда тем этого задания кафедра, руководимая В.Д. Беляковым, внесла значительный вклад. Также Виталий Дмитриевич продолжал искать пути устранения противоречий в эпидемиологической терминологии и сближения ее с биологическими трактовками.

Он убедился, что симбиотические отношения факультативных паразитов с хозяевами и смены типов их питания зависят от изменений условий пребывания вне организма или проникновения в других хозяев, в том числе относящихся к низшим организмам [9, 10]. Поэтому он настаивал на приоритете понятий «факультативные паразиты и внеорганизменная фаза» перед традиционными терминами «сапрофиты и сапрофитическая фаза» существования возбудителя. Здесь он с позиции

эволюции паразитизма и патогенности потенциальных возбудителей инфекций объясняет свойства полипатогенности и политропности зоонозов, зооантропонозов и сапронозов и их отличие от облигатных антропонозов. Отметим ещё одно направление плодотворной деятельности В.Д. Белякова — совершенствование естественно-научных и прикладных классификаций болезней человека, в том числе с позиций генетики. В это же время он пересматривает своё прежнее отрицательное отношение к «неинфекционной» эпидемиологии, «претендующей» на самостоятельность или объединение с традиционной дисциплиной. Вероятно, к этому он шёл много лет, однако считал, что прежде нужно завершить формирование фундамента эпидемиологии инфекционных болезней человека — её общей теории (парадигмы).

Используя методы формальной логики и философии, которыми Виталий Дмитриевич в совершенстве овладел, сотрудничая с философами по актуальным проблемам медицины, он блестяще сформулировал новые определения эпидемического процесса и эпидемиологии инфекционных болезней. Уточнил их структуру, содержание, основные теоретические положения и изложил их в учебнике «Эпидемиология» (1989), написанном совместно с профессором Р.Х. Яфаевым [19]. Правда, на наш взгляд, имеется возможность для некоторых уточнений во 2-м и 3-м разделах структуры эпидемического процесса. Позже ученики академика нашли варианты их паллиативной корректировки в русле воззрений самого автора и представили на обсуждение специалистов [11, 20]. Однако двойственная суть содержания термина «эпидемический процесс» и третья сущность его как предмета эпидемиологии, закрепившиеся со времен Л.В. Громашевского, распространяли действие этих формулировок только на антропонозы и зооантропонозы.

Противоречие заключалось в том, что заболеваемость человека при зоонозах (сапрозоонозах) без передачи возбудителя среди людей называть эпидемическим процессом нелогично. Ведь выживания вида возбудителя среди людей нет: оно реализуется в резервуаре животных (растений, прокариот), а у людей возникают только инфекционные процессы, сходные с эпидемическими проявлениями неинфекционных заболеваний. Виталий Дмитриевич нашел выход в иной трактовке предмета эпидемиологии, состоящей в объединении двух аспектов дисциплины в «общемедицинскую» эпидемиологию с единым предметом изучения — заболеваемостью населения. Этим он решил все главные общие вопросы содержания теории единой эпидемиологической науки и практики, что сблизило ее с формулировками экспертов ВОЗ. В результате отпала необходимость называть эпидемическим процессом заболеваемость людей, связанную с возбудителями зоонозов и сапронозов: к ней лучше подходит термин «эпи-

ЮБИЛЕИ

демические проявления» эпизоотического (эпифитотического) процесса. Его можно использовать и при эпидемиологической характеристике неинфекционной заболеваемости населения.

Учитывая формат обзора и специфику журнала, мы решили не углубляться в рассмотрение важнейшего аспекта деятельности В.Д. Белякова — обоснования теории единой дисциплины, объединяющей ее инфекционный и неинфекционный разделы. Виталий Дмитриевич своевременно успел заложить фундаментальные теоретические положения, обозначив предметом единой эпидемиологии и двух упомянутых разделов «заболеваемость населения» независимо от этиологии заболеваний. Основой единства всех трех дисциплин стали общность причин и условий заболеваемости, механизмов ее формирования и вариантов проявлений, целей и задач профилактики, единая формулировка сущности заболеваемости как результата взаимодействия экзогенных патогенов с восприимчивыми людьми при регулирующем влиянии социальных и природных условий [21–23]. Разница заключается в природе экзогенного патогена — саморегулирующейся паразитарной системы или неживой, но тоже регулирующейся на популяционном уровне жизни глобальными природными и социальными условиями в планетарных и космических масштабах. Зато имеется сходство в сущности закономерностей восприимчивости людей и гено- и фенотипической обусловленности сопротивляемости макроорганизмов повреждающему действию экзогенных патогенов. Эта тема будет нами освещена в публикациях соответствующих заинтересованных изданий, поскольку отражает ещё один триумф отечественной эпидемиологии по сравнению с зарубежными научными школами, требующий дальнейшего развития. В этом состоит величайшая заслуга академика и двух его школ, ведь никто, кроме него, после Л.В. Громашевского не смог так кардинально перестроить всю основу теории эпидемиологической науки, «заглянув» в будущий век. Нет подобной стройной теории и в развитых западных странах, хотя в практике «неинфекционной» эпидемиологии есть успехи, которые нужно учитывать [20, 24, 25].

Таким образом, теория саморегуляции паразитарных систем, получившая название биологического фундамента данного раздела единой эпидемиологии, утвердилась в инфектологии, в значительной степени усилила экологическое направление эпидемиологии инфекционных болезней и окончательно сблизила её с биологическими дисциплинами. Методология её разработки была использована В.Д. Беляковым и его учениками при формировании общего фундамента теории единой эпидемиологии. Однако это только начало: впереди огромная работа по развитию практического аспек-

та эпидемиологии неинфекционных заболеваний и, возможно, интеграции двух разделов в единую дисциплину. Пока определённо можно говорить только о формировании парадигмы современной эпидемиологии инфекционных болезней человека. Парадигма включает все рациональное из прошлых теорий, в том числе основной закон паразитизма Л.В. Громашевского; принцип, заложенный им в теорию механизма передачи применительно к антропонозам, распространённый позже на другие классы инфекций с учётом резервуаров возбудителей; термин «эпидемический процесс» и другие категории. В парадигму входят основы теории природной очаговости зоонозных трансмиссивных инфекций Е.Н. Павловского с включением разделов нетрансмиссивных зоонозов и сапрозоонозов (В.И. Терских, Г.П. Сомов, В.Ю. Литвин и др.). В структуре парадигмы находят свое место научные обобщения и уточнения современных учёных — академиков Б.Л. Черкасского, В.И. Покровского, Н.И. Брико (ученика И.И. Елкина и В.Д. Белякова), В.В. Шкарина, В.В. Малеева и др. [24–26]. К ним относятся социально-экологическая концепция эпидемического процесса; обзоры по вопросам глобализации, эволюции и влияния на демографию инфекционной заболеваемости; обобщения по проблемам «новых» и ассоциированных инфекций и т.д. Группой ведущих учёных страны под руководством академика РАН профессора Н.И. Брико разработана Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обобщены результаты разработки и применения новейших средств и методов профилактических мероприятий; совершенствования систем эпидемиологического надзора, прогнозирования заболеваемости и управления эпидемическим процессом и т.п. Невозможно в данной статье перечислить даже всех крупных учёных, внёсших свой вклад в разработку парадигмы эпидемиологии XXI в. А ведь у них есть собственные научно-педагогические школы, ученики и последователи по всей стране, продолжающие их дело.

Важнейшей чертой характера В.Д. Белякова всегда было стремление воплотить свои идеи в практике, науке и учебно-методической работе, в том числе на уровне организации эпидемиологического образования в стране. По замыслу академика был разработан паспорт специальности «Эпидемиология», включающий разделы, касающиеся неинфекционных болезней. Он был окончательно утверждён приказом Минобрнауки от 23.10.2017 № 1027 и зарегистрирован Минюстом России 20.11.2017 спустя много лет после кончины академика, который не дождался триумфа дела своей жизни [26, 27]. В итоге, многие идеи академика либо реализованы, либо находятся в разработке в системе медицинского образования, а в перспективе, надеемся, будут внедрены

и в практику профилактического здравоохранения. Это редкий пример потрясающего предвидения и мужества, ведь Виталий Дмитриевич начинал разрабатывать свои идеи задолго до вступления России в Болонский процесс (Единое европейское образовательное пространство), состоявшегося в 2003 г. Оно «вынудило» нашу медицину ускорить интеграцию с Европейской системой образования и здравоохранения, что, видимо, к лучшему. Очевидно, настало время для такой интеграции в эпидемиологической науке и практике на новом этапе развития медицины и здравоохранения, что должно принести пользу человечеству. Главное теперь — сохранить и развивать в этих общих рамках достижения отечественной эпидемиологии, которые получены наукой и здравоохранением нашей страны, в том числе в немалой степени благодаря Виталию Дмитриевичу и его ученикам.

Нельзя не упомянуть главные достижения академика Белякова в совершенствовании и реформировании медицинского образования. Так, по его инициативе санитарно-гигиенические факультеты медицинских вузов были переименованы в медико-профилактические, что подняло их на более высокий уровень подготовки эпидемиологов и гигиенистов. Преподавание курса эпидемиологии в 1-м Московском медицинском институте им. И.М. Сеченова распространилось на многие дисциплины факультета последиplomного образования. Виталий Дмитриевич лично руководил разработкой принципиально новых учебных программ по общей эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний для студентов всех факультетов медицинских вузов страны [28, 29]. Кроме того, под его руководством в 1990-е гг. были разработаны модель специалиста врача-эпидемиолога, новые программы и учебно-методические комплексы для студентов санитарно-гигиенического и лечебного факультетов, типовая программа первичной специализации (интернатуры) выпускников медико-профилактических факультетов медицинских вузов по специальности «врач-эпидемиолог» и другие учебно-методические и организационные документы, и это далеко не все. В этом направлении его ученики и последователи продолжают сегодня развивать учебно-методическую работу в системе высшего медицинского образования, хотя в практической деятельности в сфере эпидемиологии неинфекционных болезней есть проблемы, связанные с финансированием, кадровой политикой и другими вопросами. Российские эпидемиологи, вооружённые передовой отечественной теорией, и наша система здравоохранения с её опытом мобилизационных действий в экстремальных условиях, как показывает ситуация с коронавирусной пандемией в России, безусловно, добились определённого успеха в борьбе за здоровье и жизни людей. Несомненно, в этом огромная заслуга науки и здравоохране-

ния, в том числе за счёт реализации идей академика В.Д. Белякова и его последователей в нашей стране.

Виталий Дмитриевич является автором и соавтором более 500 научных работ, в том числе 12 учебников и учебных пособий, двух десятков монографий и научных сборников, посвящённых крупным теоретическим проблемам эпидемиологии. Монография «Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий» (1981), написанная им в соавторстве с Ю.Г. Иванниковым и А.А. Дегтяревым, была отмечена в 1982 г. Президиумом АМН СССР премией им. Н.Ф. Гамалеи [30]. Под его руководством подготовлены 12 докторов и более 40 кандидатов медицинских наук. За заслуги перед Родиной, ее Вооружёнными силами и отечественной наукой Виталий Дмитриевич был награждён орденами Трудового Красного знамени, Отечественной войны I степени, Красной Звезды, многими медалями, в том числе иностранных государств. Он выступил одним из учредителей РАЕН и руководил секцией биомедицины этой академии, был избран почётным членом ряда зарубежных научных обществ эпидемиологов и микробиологов. В течение многих лет Виталий Дмитриевич возглавлял Центральную проблемную учебно-методическую комиссию по эпидемиологии, был членом бюро отдела профилактической медицины РАМН, членом президиума Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов им. И.И. Мечникова, заместителем главного редактора «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунологии», а также членом многих диссертационных советов и специальных комиссий.

Академик В.Д. Беляков был яркой личностью, выдающимся лектором и педагогом, обладал глубоким философским умом, эрудицией, даром руководителя. Он внёс большой вклад в развитие теории и практики эпидемиологии, совершенствование её преподавания и до конца своих дней оставался мудрым учителем и примером для своих многочисленных учеников. Научные идеи, выдвинутые В.Д. Беляковым, результаты его исследований и практические рекомендации остаются актуальными и востребованными в наше время, а прогнозы и гипотезы подтверждаются жизнью. В заключение следует еще раз подчеркнуть, что замечательный ученый-эпидемиолог мирового уровня, талантливый педагог и руководитель со стратегическим кругозором академик В.Д. Беляков останется в нашей памяти как крупный реформатор и новатор в области медико-профилактической науки, эпидемиологической практики и образования в сфере всей медицины, опередивший свое время. Его имя, безусловно, стоит в одном ряду с именами таких корифеев отечественной медицины и эпидемиологии, как Д.К. Заболотный, Е.Н. Павловский и Л.В. Громашевский.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Белов А.Б., Корольков В.Ф. *Основы учения об эпидемическом процессе*. СПб.: 1997.
2. Огарков П.И., Ишкильдин М.И. *Академик В.Д. Беляков и его вклад в развитие отечественной эпидемиологии*. СПб.: Бостон-спектр; 2001.
3. Белов А.Б., Огарков П.И., Ишкильдин М.И., Миндлина А.Я., Брико Н.И., Зенкевич Е.С. Виталий Дмитриевич Беляков – выдающийся ученый-эпидемиолог. *История медицины*. 2014; (2): 27–36.
4. Беляков В.Д. *Иммунопрофилактика в эпидемиологии*. М.: Медицина; 1961.
5. Рогозин И.И., Беляков В.Д., Яфаев Р.Х., ред. *Избранные вопросы эпидемиологии. Сборник работ зарубежных авторов*. М.: Медицина; 1964.
6. Беляков В.Д. *Эпидемический процесс. Теория и метод изучения*. Ленинград: Медицина; 1964.
7. Беляков В.Д. *Военная эпидемиология. Учебник*. Ленинград: Медицина; 1976.
8. Терских В.И. Сапронозы (о болезнях людей и животных, вызываемых микробами, способными размножаться вне организма во внешней среде, являющейся для них местом обитания). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1958; 35(8): 118–22.
9. Литвин В.Ю., ред. *Экология возбудителей сапронозов. Сборник научных трудов АМН СССР*. М.; 1988.
10. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. *Псевдомонады и псевдомонозы*. М.: Медицина; 1990.
11. Белов А.Б., Панин А.Л. Теория сапронозных инфекций: история развития и пути совершенствования в системе медико-биологических наук. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(1): 91–101. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-91-101>
12. Беляков В.Д., Рогозин И.И. *Ассоциированная иммунизация и экстренная профилактика*. Ленинград: Медицина; 1968.
13. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. *Иммунологический анализ в эпидемиологии*. Ленинград: Медицина; 1969.
14. Беляков В.Д., Колесов А.П., Остроумов П.Б., Немченко В.И. *Госпитальная инфекция*. Ленинград: Медицина; 1976.
15. Беляков В.Д., Ходырев А.П., Тоголян А.А. *Стрептококковая инфекция*. Ленинград: Медицина; 1978.
16. Беляков В.Д., Остроумов П.Б., Селиванов А.А., Ходырев А.П., Иванов К.Г. Диплом патентного ведомства СССР № 317 на научное открытие «Явление внутренней регуляции эпидемического процесса»; 1986.
17. 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.
18. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. *Саморегуляция паразитарных систем*. Ленинград: Медицина; 1987.
19. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. *Эпидемиология. Учебник*. М.: Медицина; 1989.
20. Белов А.Б. Решенные и проблемные теоретические вопросы эпидемиологической науки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (2): 7–15.
21. Беляков В.Д. *Структурно-системный подход в медицине. Актовая речь*. Ленинград; 1981.
22. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Чаплин А.В., Каминский Г.Д. *Общие принципы и методические основы эпидемиологии неинфекционных заболеваний. Том 1*. М.: Медицина; 1986: 72–91.
23. Беляков В.Д. *Эволюция структуры медицинской науки и ее отражение в системе медицинского образования. Актовая речь*. М.; 1989.
24. Черкасский Б.Л. Российская и американская эпидемиологическая школы: сравнительный анализ. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1999; (4): 9–12.
25. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. О концепции развития отечественной эпидемиологии: 5 лет спустя. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013; (1): 9–14.
26. Брико Н.И. *Парадигма современной эпидемиологии. Актовая речь*. М.; 2013.
27. Приказы Министерства образования и науки Российской Федерации от 25.02.2009 г. № 59 (рег. № 13561) и от 23.10.2017 г. № 1027 (рег. № 48962) «О паспортах научных специальностей».
28. Беляков В.Д. *Избранные лекции по общей эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний*. М.: Медицина; 1995.
29. Беляков В.Д., Семенов Т.А., Шрага М.Х. *Введение в эпидемиологию инфекционных и неинфекционных заболеваний*. М.: Медицина; 2001.
30. Беляков В.Д., Дегтярев А.А., Иванников Ю.Г. *Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий*. Ленинград: Медицина; 1981.

REFERENCES

1. Belov A.B., Korol'kov V.F. *Tenets of the Epidemic Process [Osnovy ucheniya ob epidemicheskoy protsesse]*. St. Petersburg; 1997. (in Russian)
2. Ogarkov P.I., Ishkil'din M.I. *Academician V.D. Belyakov and His Contribution to the Development of the National Epidemiology [Belyakov i ego vklad v razvitie otechestvennoy epidemiologii]*. St. Petersburg: Boston-spektr; 2001. (in Russian)
3. Belov A.B., Ogarkov P.I., Ishkil'din M.I., Mindlina A.Ya., Briko N.I., Zenkevich E.S. Vitaly Dmitrievich Belyakov – an outstanding scientist and epidemiologist. *Istoriya meditsiny*. 2014; (2): 27–36. (in Russian)
4. Belyakov V.D. *Immunoprophylaxis in Epidemiology [Immunoprofilaktika v epidemiologii]*. Moscow: Meditsina; 1961. (in Russian)
5. Rogozin I.I., Belyakov V.D., Yafaev R.Kh., eds. *Selected Questions of Epidemiology. Collection of Works by Foreign Authors [Izbrannye voprosy epidemiologii. Sbornik rabot zarubezhnykh avtorov]*. Moscow: Meditsina; 1964. (in Russian)
6. Belyakov V.D. *The Epidemic Process. Theory and Method of Study [Epidemicheskij protsess. Teoriya i metod izucheniya]*. Leningrad: Meditsina; 1964. (in Russian)
7. Belyakov V.D. *Military Epidemiology: Textbook [Voennaya epidemiologiya. Uchebnik]*. Leningrad: Meditsina; 1976. (in Russian)
8. Terskikh V.I. Saprinoses (about diseases of people and animals caused by microbes that can reproduce outside the body in the external environment, which is their habitat). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1958; 35(8): 118–22. (in Russian)
9. Litvin V.Yu., ed. *Ecology of the Saprinoses Pathogens. Collection of scientific works of the Academy of Medical Sciences of the USSR [Ekologiya vozбудiteley sapronozov. Sbornik nauchnykh trudov AMN SSSR]*. Moscow; 1988. (in Russian)
10. Belyakov V.D., Ryapis L.A., Ilyukhin V.I. *Pseudomonas and Pseudomonosis [Pseudomonady i psevdomonozy]*. Moscow: Meditsina; 1990. (in Russian)
11. Belov A.B., Panin A.L. Theory of sapronous infections: The history of development and ways of improvement in the system of biomedical sciences. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(1): 91–101. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-91-101> (in Russian)
12. Belyakov V.D., Rogozin I.I. *Associated Immunization and Emergency Prevention [Assotsirovannaya immunizatsiya i ekstremnaya profilaktika]*. Leningrad: Meditsina; 1968. (in Russian)
13. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. *Immunological Analysis in Epidemiology [Immunologicheskij analiz v epidemiologii]*. Leningrad: Meditsina; 1969. (in Russian)

14. Belyakov V.D., Kolesov A.P., Ostroumov P.B., Nemchenko V.I. *Hospital Infection [Gospital'naya infektsiya]*. Leningrad: Meditsina; 1976. (in Russian)
15. Belyakov V.D., Khodyrev A.P., Totolyan A.A. *Streptococcal Infection [Streptokokkovaya infektsiya]*. Leningrad: Meditsina; 1978. (in Russian)
16. Belyakov V.D., Ostroumov P.B., Selivanov A.A., Khodyrev A.P., Ivanov K.G. Diploma of Patent Office of the USSR № 317 on the Scientific Discover: «The Phenomenon of Internal Regulation of the Epidemic Process»; 1986. (in Russian)
17. Belyakov V.D. The internal regulation of the epidemic process (replies to comments and questions raised during the discussion of the theory). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1987; 64(10): 78–89. (in Russian)
18. Belyakov V.D., Golubev D.B., Kaminskiy G.D., Tets V.V. *Self-regulation of Parasitogenic Systems [Samoregulyatsiya parazitarnykh sistem]*. Leningrad: Meditsina; 1987. (in Russian)
19. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. *Epidemiology. Textbook [Epidemiologiya: Uchebnyk]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
20. Belov A.B. Solved problems and theoretical issues of epidemiological science. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2014; (2): 7–15. (in Russian)
21. Belyakov V.D. *Structural-Systems Approach in Medicine. Act Speech [Strukturno-sistemnyy podkhod v meditsine. Aktovaya rech']*. Leningrad; 1981. (in Russian)
22. Belyakov V.D., Golubev D.B., Chaklin A.V., Kaminskiy G.D. *General Principles and Methodical Base of Non-Infectious Diseases Epidemiology. Proceedings of Medical Sciences Academy of the USSR. Volume 1 [Obshchie printsipy i metodicheskie osnovy epidemiologii neinfektsionnykh zabolevaniy. Tom 1]*. Moscow: Meditsina; 1986: 72–91. (in Russian)
23. Belyakov V.D. *Evolution of Medical Science and Its Reflection in the Medical Education System. Act Speech [Evolutsiya struktury meditsinskoj nauki i ee otrazhenie v sisteme meditsinskogo obrazovaniya. Aktovaya rech']*. Moscow; 1989. (in Russian)
24. Cherkasskiy B.L. Russian and American epidemiological schools: a comparative analysis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 1999; (4): 9–12. (in Russian)
25. Shkarin V.V., Kovalishena O.V. Concept of the development of Russian epidemiology: 5 years later. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2013; (1): 9–14. (in Russian)
26. Briko N.I. *The Paradigm of Modern Epidemiology. Acts of Speech [Paradigma sovremennoy epidemiologii. Aktovaya rech']*. Moscow; 2013. (in Russian)
27. Orders of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation of February 25, 2009 No. 59 and October 23, 2017 No. 1027; reg. № 48962 «Passports of scientific specialties» (in Russian)
28. Belyakov V.D. *Selected Lectures on General Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases [Izbrannye lektsii po obshchey epidemiologii infektsionnykh i neinfektsionnykh zabolevaniy]*. Moscow: Meditsina; 1995. (in Russian)
29. Belyakov V.D., Semenenko T.A., Shraga M.Kh. *Introduction to the Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases in Humans [Vvedenie v epidemiologiyu infektsionnykh i neinfektsionnykh zabolevaniy]*. Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
30. Belyakov V.D., Degtyarev A.A., Ivannikov Yu.G. *The Quality and Effectiveness of Antiepidemic Measures [Kachestvo i effektivnost' protivoepidemicheskikh meropriyatiy]*. Leningrad: Meditsina; 1981. (in Russian)

Информация об авторах

Белов Александр Борисович — к.м.н., доцент кафедры общей и военной эпидемиологии ВМедА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7064-9193>

Кузин Александр Александрович[✉] — д.м.н., доцент, начальник кафедры общей и военной эпидемиологии ВМедА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, paster-spb@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9154-7017>

Зобов Андрей Евгеньевич — к.м.н., преподаватель кафедры общей и военной эпидемиологии ВМедА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7791-8993>

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

Статья поступила в редакцию 20.06.2021;
принята к публикации 01.09.2021;
опубликована 30.10.2021

Information about the authors

Alexander B. Belov — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of common and military epidemiology, S.M. Kirov Military Academy, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7064-9193>

Alexander A. Kuzin[✉] — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of common and military epidemiology, S.M. Kirov Military Academy, St. Petersburg, Russia, paster-spb@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9154-7017>

Andrey E. Zbov — Cand. Sci. (Med.), teacher, Department of common and military epidemiology, S.M. Kirov Military Academy, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7791-8993>

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

The article was submitted 20.06.2021;
accepted for publication 01.09.2021;
published 30.10.2021

РЕЦЕНЗИИ

Рецензия на учебник академика РАН Р.М. Хаитова «Иммунология» (М.: ГЕОТАР-Медиа, 2021 г.)

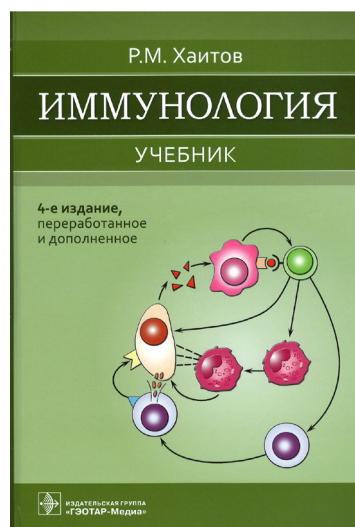


Учебник «Иммунология», 4-е издание, подготовил известный советский и российский учёный с мировым именем, иммунолог, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Рахим Мусаевич Хаитов. Новое издание — это обновлённая, переработанная и дополненная версия учебника, который за последние 15 лет стал одним из лучших учебников по иммунологии. Он используется повсеместно. По всей России и в странах СНГ по нему учатся студенты вузов медицинского и биологического профиля, готовятся врачи, избравшие профессию аллергологов и иммунологов, им пользуются исследователи в самых разных естественных науках — иммунологии, аллергологии, микробиологии, вирусологии, инфектологии, вакцинологии и других смежных с ними науках. Словом, учебник «Иммунология» Р.М. Хаитова — это один из лучших в нашей стране, один из самых востребованных и признанных учебников.

В чем достоинства этого учебника? В чем причины успеха прежних изданий и основы для успеха нового, 4-го, издания? Тут много факторов, и все они важны:

- хороший, доступный язык изложения;
- множество иллюстраций, облегчающих понимание и освоение нового материала;
- простота объяснения очень сложных живых систем и процессов;
- широкий, практически всеобъемлющий охват областей иммунологии;
- современность, представление самых последних достижений в областях науки, которым учит этот учебник;
- достоверность и научное качество сведений, составляющих содержание учебника;
- практическая ориентированность научных знаний, всегда направленная на их полезное применение в интересах здоровья человека.

Современное научное знание об иммунитете — это огромный объем сведений. Учебник иммунологии должен помочь студентам медицинских или биологических вузов понять и запомнить самое важное и при этом не утопить обучающихся в изобилии научных фактов, способах их получения, зна-



чения этих знаний для нашей иммунной защиты от различных опасностей.

Сколь угодно сложные структуры и процессы, их взаимные влияния необходимо представить в учебнике для студентов в максимально упрощённом, понятном виде. Упрощая, нельзя исказить природу живой системы, описываемых в ней объектов и событий. Недопустимо отойти от научного знания об этих объектах и явлениях, с ними связанных. Для схематизации и упрощения сложных процессов полезны графические иллюстрации, и к ним предъявляются те же требования — не исказить действительности, не сформировать ложных представлений, которые не соответствуют истинной природе описываемых объектов и явлений. В учебнике Р.М. Хаитова схемы и пояснения к ним просты и понятны, вполне соответствуют строгим научным представлениям, достаточны для быстрого понимания и запоминания, что является несомненным достоинством этой книги.

Учебник иммунологии должен отразить или хотя бы обозначить все самые значительные области иммунологии. Именно таким и является учебник Р.М. Хаитова. При самом придирчивом анализе не удаётся найти каких-либо значительных разделов современной иммунологии, которых бы не было в книге Р.М. Хаитова. Специализированные области иммунологии, такие как иммунология

опухолей и иммунология старения, без сомнений, не включены в структуру этого учебника преднамеренно. Эти разделы иммунологии оставлены для самостоятельных, специализированных учебников, поскольку указанные области науки очень сложны и их целесообразно рассматривать отдельно, обстоятельно и всерьёз. Впрочем, автор может восполнить этот пробел в следующем издании учебника, т.к. им опубликованы ряд оригинальных и обзорных статей по этой теме. В частности, монография «Иммунитет и рак» (Р.М. Хаитов, З.Г. Кадагидзе, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018). Это же касается и иммунологии старения. Р.М. Хаитов опубликовал достаточно экспериментальных и обзорных статей по иммунологии старения.

В учебнике Р.М. Хаитова есть всё, что составляет содержание науки иммунология:

(а) понимание предназначения иммунитета, его особенной роли, границ ответственности этой системы в организме живого существа;

(б) знание, что функция иммунной защиты обеспечивается определёнными типами клеток и молекул, процессами, в которых они участвуют и которые они выполняют;

(в) сведения о природе и свойствах многих сотен типов и подтипов клеток, стадий их развития и преобразования в ходе выполнения своих функций. Детальные знания о большом разнообразии веществ, обеспечивающих координированное функционирование клеточных сообществ и, в конечном счёте, иммунную защиту живого существа;

(г) знания о процессах иммунного реагирования и иммунной защиты на всех уровнях: от уровня целого организма, его отдельных органов и систем до уровня клеток, молекул и атомов, составляющих эти молекулы, реакций, в которых происходят химические и физические превращения на молекулярном и супрамолекулярном уровнях.

Особо следует отметить, что значительная часть учебника посвящена патологическим процессам, при которых функционирование иммунной системы значительно нарушено — иммунные дефициты, аллергия, аутоиммунные болезни. Это несомненное достоинство учебника. В этих разделах фундаментальные знания иммунологии проецируются на клинически значимые, практически важные области медицины. Яркими примерами успешного клинического применения указан путь от фундаментальной иммунологии к практике медицины и здоровью человека, что очень важно при обучении нового поколения медиков и биологов;

(д) большой интерес представляет раздел по вакцинации. Сформулированы требования к вакцинирующим препаратам. Рассмотрены новые поколения вакцин, в том числе векторные вакцинирующие препараты (Гам-КОВИД-Вак) против новой коронавирусной инфекции, вакцины на основе ну-

клеиновых кислот (ДНК- и РНК-вакцины), аллерговакцины.

Учебник иммунологии обязан содержать фундаментальные знания, многие из которых добыты давно. Студенту необходимо узнать основополагающие факты, о которых учёные узнали год, 10 или 100 лет назад. То есть в учебнике должна быть представлена информация, ставшая классической и неоднократно описанная во многих предшествующих учебниках и руководствах по иммунологии. В то же время хороший учебник обязан быть максимально современным, содержать самые последние достижения в данной области науки и техники. Сочетание классического знания и суперсовременных сведений в одном издании — это сложная задача для автора. Классику описать не сложно, да и то нельзя просто переписать у предшественников. Нужно умудриться подать фундаментальные основы, хорошо известные всем специалистам в данной области, в каком-то оригинальном виде, при этом не потеряв главного — сути этих принципиальных знаний. Так в иммунологии из учебника в учебник кочуют сведения о структуре иммуноглобулинов и генов, кодирующих эти белки, о факторах и реакциях в системе комплемента, о механизмах экстравазации лейкоцитов при воспалении и многие другие классические знания, которые не менялись в течение десятилетий, но без которых трудно представить полноценный учебник иммунологии.

Наряду с классическими, основополагающими, сведениями учебник должен дать самые последние, самые современные достижения, открытия, факты, знания. А это совершенно иной пласт науки. Это то, что интенсивно разрабатывается и изучается в настоящее время, обсуждается на периодических встречах профессионалов (конгрессы, конференции, симпозиумы, рабочие совещания), публикуется в профессиональных научных журналах. В учебнике должны быть охвачены все значительные области иммунологии, но следить за публикацией последних достижений во всех областях очень сложно или почти невозможно. Это одна из самых трудных задач для автора учебника. Несмотря на трудность задачи, в рецензируемом издании Р.М. Хаитову успешно удалось представить как общие, классические, сведения, формирующие основы иммунологии, так и наиболее интересные и перспективные новые достижения этой науки.

Последние годы сильно изменили биологию в целом и иммунологию в частности. Причина тому — технологическая революция, которая произошла в последние 20–25 лет и по сей день продолжается с нарастающей скоростью. Эта революция основывается на создании мощных компьютеров с огромными скоростями действия и практически неограниченными объёмами памяти. Важно и то, что эти компьютеры стали доступны всем, ими можно

РЕЦЕНЗИИ

пользоваться, выходя в сеть со своего ноутбука. В свою очередь, мощные компьютерные системы позволили создать автоматизированные системы анализа, синтеза, секвенирования, измерения концентраций тысяч веществ и многое другое, что потрясает воображение. Раньше иммунологи анализировали одну или несколько клеточных популяций, один или несколько клеточных белков (цитокины, хемокины, рецепторы и т.д.), измеряли экспрессию мРНК одного или нескольких генов. Теперь в одном анализе можно получать данные об экспрессии всех (более 20 тыс.) генов, продукции сотен белков, структуре миллионов рецепторов (TCR- и BCR-секвенирование). Современные системы и методы исследования дают гигантские массивы данных, которые невозможно анализировать, как раньше. Чтобы соответствовать современному уровню, биолог (иммунолог) теперь не может ограничиться флуоресценцией одного или нескольких белков в клетке (микроскопия, цитометрия) или измерением уровня экспрессии мРНК одного или нескольких генов (РВ-ПЦР), или измерением концентрации нескольких цитокинов в биологической жидкости (иммуноферментный или иммунохемилюминесцентный анализ). Теперь метод РНК-секвенирования даёт возможность оценить экспрессию мРНК сразу всех генов, а мультиплексные методы протеомики — продукцию сразу многих сотен белков. Раньше иммунолог окрашивал интересующий его белок на гистологическом срезе (иммуногистохимия), а теперь мультиплексная иммуногистофлуоресценция использует окрашивание до 50 молекулярных маркёров на одном гистологическом срезе, что позволяет типировать каждую клетку, а затем переводить эту информацию в виртуальный (компьютерный) образ, где уже нет среза, но есть вся информация о нём. Такой виртуальный гистологический срез содержит информацию о каждой клетке, её позиции и молекулярных особенностях, размерах и форме клеток, количестве клеток разных типов, контактах любых клеток друг с другом, дистанции между клетками одного типа или клетками разных типов, клеточных скоплениях и сообществах и т.д., и т.п. Компьютерная система может содержать подобную информацию о сотнях полей зрения на одном срезе, может сравнивать десятки и сотни разных срезов между собой. Компьютерные системы обучены реконструировать структуру ткани в объёме (виртуальные 3D-изображения), могут «крутить» это изображение в пространстве, позволяя исследователю лучше рассмотреть какие-то детали. То есть современные автоматизированные и компьютеризированные системы могут делать то, что никак не мог бы сделать гистолог. Возмож-

ности такого современного анализа бесконечно большие, но его не может выполнять классический биолог, гистолог или иммунолог. Слишком велики массивы данных. Чтобы с ними работать, нужны специальные программы и специально обученные профессионалы — биоинформатики.

Как следствие описанной революции, которая привела к получению гигантских объёмов сведений в каждом современном анализе, произошла радикальная трансформация научных публикаций в биологии вообще и в иммунологии в частности. Современные научные статьи уже настолько насыщены информацией, настолько сложны для понимания, что даже многим классическим иммунологам «не по зубам». Статьи изобилуют Heat map, PCA plot, TSNE plot, UMAP plot, Cluster map, Volcano plot и ещё десятками других форм презентации данных. Понять, что в них содержится, слишком сложно даже зрелым профессионалам-иммунологам. А как эту самую современную информацию трансформировать в простые и понятные формы для студентов, только начинающих осваивать основы иммунологии? Это весьма непростая задача для автора учебника.

На этом самом современном уровне ещё сложнее охватить все новое, что публикуется во всех значительных областях иммунологии. Исследователь может читать и знать новости в своей области науки, в которой он работает, а автор учебника должен знать всё, должен успевать следить за стремительным развитием всех областей иммунологии. Это почти невыполнимая задача. Остаётся лишь удивляться и с большим уважением констатировать, что Р.М. Хаитову это удалось. Четвёртое издание учебника «Иммунология» содержит все значительные достижения иммунологии последних лет.

Не вызывает сомнений, что 4-е издание учебника «Иммунология» Р.М. Хаитова будет по достоинству оценено студентами и преподавателями медицинских и биологических вузов, а также исследователями в самых разных областях медицины и биологии. Выход в свет этого издания — это замечательное событие, которое нам хотелось отметить, впечатлениями о котором мы делимся с читателями журнала.

*Академик РАН А.Л. Гинцбург,
академик РАН А.Г. Габибов,
академик РАН С.М. Деев,
академик РАН В.В. Зверев,
академик РАН А.Г. Румянцев,
академик РАН Х.П. Тахчиди,
академик РАН В.А. Ткачук,
академик РАН Н.Д. Юцук,
профессор Р.И. Атауллаханов*



Цикл онлайн-семинаров

Диагностика и лечение урогенитальных и внутриутробных инфекций

17-18 ноября 2021 г.



ИСМП
2021



ФБУН Центральный НИИ
Эпидемиологии
Роспотребнадзора
НАУКА НА СЛУЖБЕ ВАШЕГО ЗДОРОВЬЯ



VIII Конгресс с международным участием

Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2021)

25-26 ноября 2021 г.



Онлайн-семинар

Вирусные гепатиты: эпидемиология, диагностика и современные возможности лечения

15 декабря 2021 г.