

2024

ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ

Иллюстрация к статье «Оценка безопасности и специфической активности рекомбинантного аллергена коронавируса SARS-CoV-2 («КоронаДерм-PS») по результатам I–II фазы клинического исследования» (авторы: Т.В. Савин, А.М. Миличкина, А.А. Краснов, Р.Н. Кузнецова, Е.Е. Щедеркина, А.В. Сварваль, А.А. Шарова, Д.Э. Рейнгардт, Ю.В. Останкова, А.В. Губанова, О.А. Петрова, О.Б. Жимбаева, А.П. Разумовская, И.В. Дрозд, А.А. Рубинштейн, А.С. Трулев, И.В. Кудрявцев, А.А. Рябченкова, Е.Л. Чирак, Е.Р. Чирак, А.И. Саенко, В.В. Копать, И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян) (с. 900–916)

Illustration for the article “Safety and specific activity of the recombinant SARS-CoV-2 allergen (“CoronaDerm-PS”) based on phase I–II clinical trial results” (authors: Savin T.V., Milichkina A.M., Krasnov A.A., Kuznetsova R.N., Shchederkina E.E., Svarval A.V., Sharova A.A., Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Gubanova A.V., Petrova O.A., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Drozd I.V., Rubinshtein A.A., Trulev A.S., Kudryavtsev I.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kopat’ V.V., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S., Totolian A.A.) (pp. 900–916)



Рисунок 1. Примеры результата кожной реакции на препарат «КоронаДерм-PS»

Figure 1. “CoronaDerm-PS” skin tests results

Примечание. А) Положительный результат кожного теста «КоронаДерм-PS»; Б) сомнительный результат кожного теста «КоронаДерм-PS»; В) ложноположительный результат кожного теста «КоронаДерм-PS»; Г) отрицательный результат кожного теста «КоронаДерм-PS».

Note. A) “CoronaDerm-PS” skin test positive result; B) “CoronaDerm-PS” skin test controversial result; C) “CoronaDerm-PS” skin test false-positive result; D) “CoronaDerm-PS” skin test negative result.

Иллюстрации к статье «Биосинтез новых нанокapsул MnO_2 с помощью экстракта *C. spinosa* и хитозана медоносной пчелы: изучение антибактериальных и противораковых свойств» (авторы: М.Г. Эльхарриф, Н.А. Хасан, М. Шараф) (с. 1002–1016)

Illustrations for the article “Biosynthesis of novel MnO_2 nanocapsules via *C. spinosa* extract and honeybee-derived chitosan: exploring antibacterial and anticancer properties” (authors: Elharrif M.G., Hassan N.A., Sharaf M.) (pp. 1002–1016)

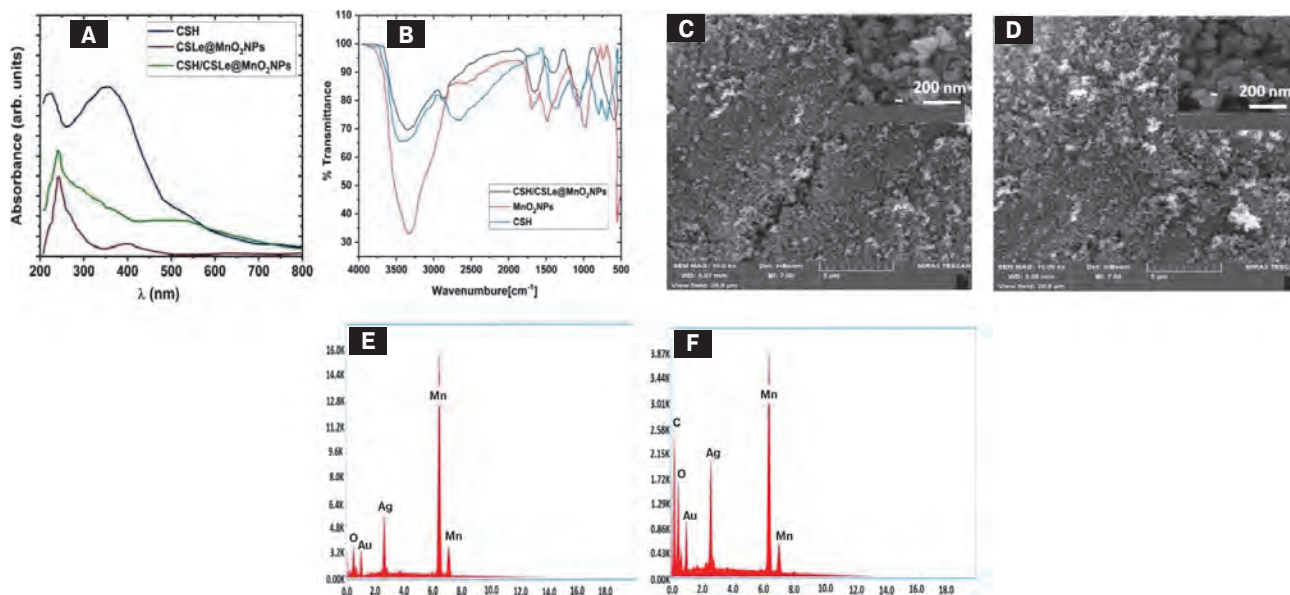


Figure 2. Physico-chemical characterization (A) UV-Vis spectroscopic, (B) FTIR of CSH, CSH/CSLe@ MnO_2 NPs, and CSH/CSLe@ MnO_2 NPs, (C and D) SEM image (magnification 5 μm and 200 nm), and (E and F) EDX microphotographs of CSH/CSLe@ MnO_2 NPs, and CSH/CSLe@ MnO_2 NPs composite

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

сентябрь–октябрь
2024, том 14

№ 5

Журнал издается при участии Отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов по Санкт-Петербургу и Ленинградской области

Главный редактор

Тотоян Арег А. д.б.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Мокроусов И.В. д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейродегенерации Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
Брей П. д.б.н., профессор, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней Института Пастера в Лаосе, Вьентьян, Лаос
Гинцбург А.Л. д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Лаврентьева И.Н. д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Лобзин Ю.В. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Лоуизр Э. профессор, президент Института Пастера Туниса, Тунис
Львов Д.К. д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Маеда К. д.вет.н., профессор, директор Национального института инфекционных заболеваний, Токио, Япония
Медуницын Н.В. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
Михайлов М.И. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
Найденски Х. д.м.н., профессор, зав. отделом инфекционной микробиологии Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, зам. председателя Российской академии образования, Москва, Россия
Покровский В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
Сантони А. зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
Симбирцев А.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Черешнев В.А. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
Шпигель А. д.м.н., профессор, директор Института Пастера Камбоджи, Пномпень, Камбоджа

Редакционный совет

Алешкин В.А.	д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
Бухарин О.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
Вишневский Б.И.	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
Долгушин И.И.	д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
Зверев В.В.	д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Кафтырева Л.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Кашкин К.П.	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
Кубарь О.И.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Малеев В.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
Савичева А.М.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Сельков С.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Тец В.В.	д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
Харит С.М.	д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Чекнев С.Б.	д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия
Шкарин В.В.	д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

Ответственный секретарь: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)
Редактор перевода: Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)
Выпускающий редактор: Мурадян А.Я., к.м.н. (Санкт-Петербург)
Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Учредители

Северо-Западное отделение медицинских наук
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Санкт-Петербургу и Ленинградской области
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00578 от 26 апреля 2010 г.
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00910 от 24 июня 2011 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77–64788 от 02 февраля 2016 г.

Электронная версия журнала: www.iimmun.ru и www.elibrary.ru

С 2012 года журнал «Инфекция и иммунитет» входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

С 2014 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory

С 2016 года включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI), интегрированную с платформой Web of Science

С 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

С 2017 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Scopus

Адрес редакции:
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: (812) 233-08-58.

Издательство НИИЭМ имени Пастера
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»
196084, Санкт-Петербург,
наб. Обводного канала, 88, литера С,
помещ. 7-Н, оф. 1, 2.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 28.10.2024 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1205

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2024
© НИИЭМ имени Пастера, 2024
© СПб РО РААКИ, 2024

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

September–October

2024, volume 14

No. 5

The journal is published with the assistance of the Branch of All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists for St. Petersburg and Leningrad Region

Editor-in-chief

Areg A. Totolian DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy editor-in-chief

Igor V. Mokrousov DSc (Biology), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Russian Federation

Members of editorial board

- Alexander S. Apt** DSc (Biology), Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation
- Luis Barbeito** MD, PhD, Professor, Institut Pasteur de Montevideo, Head of the Laboratory of Neurodegeneration, Montevideo, Uruguay
- Paul Brey** PhD, Professor, Institut Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos
- Alexander L. Gintsburg** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
- Irina N. Lavrentieva** DSc (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation
- Yuri V. Lobzin** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Hechmi Louzir** Professor, Institut Pasteur de Tunis, President, Tunis, Tunisia
- Dmitry K. Lvov** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation
- Ken Maeda** PhD, DVM, Professor, National Institute of Infectious Diseases, Director, Tokyo, Japan
- Nikolai V. Medunitsyn** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation
- Michael I. Michailov** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Microbiology and Virology, Moscow, Russian Federation
- Hristo Najdenski** PhD, Professor, Institute Stephan Angeloff; Head of the Department of Infectious Microbiology, Sofia, Bulgaria
- Gennadiy G. Onishchenko** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Deputy President of the Russian Academy of Education, Moscow, Russian Federation
- Vadim V. Pokrovskiy** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation
- Angela Santoni** PhD, Professor, Institut Pasteur in Italy — Cenci Bolognetti Foundation, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy
- Andrei S. Simbirtsev** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Irina S. Freidlin** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Valery A. Chereshev** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation
- Andre Spiegel** MD, PhD, Professor, Institut Pasteur du Cambodge, Director, Phnom Penh, Cambodia

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin	DSc (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	DSc (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	DSc (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Scientific Director, Moscow, Russian Federation; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
Lidiia A. Kaftyreva	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	DSc (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei A. Selkov	DSc (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
Viktor V. Tets	DSc (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	DSc (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei B. Cheknev	DSc (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation
Vyacheslav V. Shkarin	DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Assistant editor: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)

Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)

Copy editor: Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)

Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

Founders

North-West Regional Branch of Medical Sciences

Saint Petersburg Pasteur Institute

Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region

Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010

Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media

Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

Electronic version: www.iimmun.ru and www.elibrary.ru

Since 2012, the Infection and Immunity journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Infection and Immunity journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus database

Editorial Office

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: +7 (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: +7 (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,
Naberezhnaya Obvodnogo Kanala, 88,
build. C, suite 7-H, off. 1, 2.
Phone/fax: +7 (812) 388-90-00.

Passed for printing 28.10.2024. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2024

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2024

© SPb RAACI, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Киселева И.В., Ларионова Н.В., Желтухина А.И.

ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА ГРИППА В: РАЗНООБРАЗИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СКВОЗЬ ПРИЗМУ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ	845
---	------------

Деревянченко И.А., Краева Л.А.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И МЕДИЦИНСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА <i>LISTERIA</i>	862
---	------------

Оригинальные статьи

Зайковская А.В., Евсеенко В.А., Олькин С.Е., Пьянков О.В.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗНЫМ СУБЛИНИЯМ ОМИКРОН-ВАРИАНТА, В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК МЫШЕЙ	881
---	------------

Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Глазанова Т.В., Шилова Е.Р., Бубнова Л.Н.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА	891
---	------------

Савин Т.В., Миличкина А.М., Краснов А.А., Кузнецова Р.Н., Щедеркина Е.Е., Сварваль А.В., Шарова А.А., Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Губанова А.В., Петрова О.А., Жимбаева О.Б., Разумовская А.П., Дрозд И.В., Рубинштейн А.А., Трулев А.С., Кудрявцев И.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Копать В.В., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С., Тотолян А.А.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЛЕРГЕНА КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 («КОРОНАДЕРМ-PS») ПО РЕЗУЛЬТАТАМ I–II ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	900
--	------------

Сбарцалья В.А., Гладких А.С., Миличкина Д.М., Бачевская А.В., Попова М.Р., Шарова А.А., Черепанова Е.А., Дедков В.Г., Тотолян А.А.

СТРУКТУРА ОРВИ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 (2021–2022 гг.)	917
---	------------

Тюкавкина С.Ю., Харсеева Г.Г., Костинов М.П., Алиева А.А., Балахнова В.В., Алутина Э.Л., Чайкина В.А., Волкова В.В.

ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМОВ ПАТОГЕНОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ	927
--	------------

Попкова М.И., Филатова Е.Н., Минаева С.В., Сахарнов Н.А., Уткин О.В.

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ОСНОВНЫХ ТИПОВ И ГЕНОВАРИАНТОВ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР С КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ	936
--	------------

Комиссарова Д.В., Ларина И.М., Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., Усанова Н.А., Ильин В.К.

ВЗАИМОСВЯЗЬ <i>E. COLI</i>, <i>ENTEROBACTER</i> spp. И <i>S. AUREUS</i>, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ, С БЕЛКАМИ КРОВИ, СВЯЗАННЫМИ С ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ И ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, ВО ВРЕМЯ 3-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ	951
--	------------

Андреева И.С., Морозова В.В., Кабанов А.С.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ	961
--	------------

Замятина Е.В., Шевела А.И., Мандель И.А., Сизов А.А., Степанов А.А., Сизов Д.А., Даниленко С.О.

ОБЩИЙ ИММУНОГЛОБУЛИН Е КАК ПРЕДИКТОР НАЛИЧИЯ ЗООАНТРОПОНОЗА У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ: ОБСЕРВАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	971
--	------------

Загдын З.М., Зудин А.Б., Кобесов Н.В., Васильева Т.П., Галоян А.С., Вербицкая Е.В.

СТРУКТУРИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В РЕГИОНАХ С НИЗКОЙ И ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТЬЮ НАСЕЛЕНИЯ	981
---	------------

Улла Д., Азиз А., Улла А., Улла И., Джаббар А., Умейр М., Улла М., Улла Х., Улла М., Али И.

СТРУКТУРА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТЕРОКОККА В ПАКИСТАНЕ	995
---	------------

Эльхарриф М.Г., Хасан Н.А., Шараф М.

БИОСИНТЕЗ НОВЫХ НАНОКАПСУЛ MnO_2 С ПОМОЩЬЮ ЭКСТРАКТА <i>S. SPINOSA</i> И ХИТОЗАНА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ: ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОРАКОВЫХ СВОЙСТВ	1003
---	-------------

Краткие сообщения

Жаринова Н.В., Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Карапетян М.Г., Белозерова О.Н.

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ КОММЕРЧЕСКИХ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА БРУЦЕЛЛЫ	1017
--	-------------

Аракельян Р.С., Карпенко С.Ф., Расевич Ю.И., Исмаилов П.Э.

ОЦЕНКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА 2019 ГОД. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ	1021
---	-------------

В помощь практическому врачу

Сейтопулу К., Стамуди М., Каллиора Д., Мурцику А.

ИНФЕКЦИЯ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ, ВЫЗВАННАЯ <i>STREPTOCOCCUS EQUINUS</i>: СЛУЧАЙ ИЗ ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ	1026
--	-------------

Юбилей

К 80-ЛЕТИЮ ВАЛЕРИЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА ЧЕРЕШНЕВА	1031
--	-------------

Правила для авторов	1033
----------------------------------	-------------

Авторский указатель	1036
----------------------------------	-------------

Предметный указатель	1036
-----------------------------------	-------------

CONTENTS

Reviews

Kiseleva I.V., Larionova N.V., Zheltukhina A.I.

INFLUENZA B VIRUS EVOLUTION: DIVERSITY OF BIOLOGICAL PROPERTIES THROUGH THE PRISM OF GENETIC VARIABILITY 845

Derevyanchenko I.A., Kraeva L.A.

BIOLOGICAL FEATURES AND MEDICAL SIGNIFICANCE OF THE *LISTERIA* BACTERIA 862

Original articles

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V.

ANTIGENIC FEATURES OF THE STRAINS SARS-CoV-2 OFOMICRON SUBLINES ASSESSED BY HYPERIMMUNE MOUSE SERUM NEUTRALISATION 881

Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Glazanova T.V., Shilova E.R., Bubnova L.N.

IMMUNOGENETIC MARKERS OF COVID-19 SEVERITY IN ST. PETERSBURG RESIDENTS 891

Savin T.V., Milichkina A.M., Krasnov A.A., Kuznetsova R.N., Shchederkina E.E., Svarval A.V., Sharova A.A., Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Gubanov A.V., Petrova O.A., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Drozd I.V., Rubinshtein A.A., Trulev A.S., Kudryavtsev I.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kopat' V.V., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S., Totolian A.A.

SAFETY AND SPECIFIC ACTIVITY OF THE RECOMBINANT SARS-CoV-2 ALLERGEN (“CORONADERM-PS”) BASED ON PHASE I–II CLINICAL TRIAL RESULTS 900

Sbarzaglia V.A., Gladkikh A.S., Milichkina D.M., Bachevskaya A.V., Popova M.R., Sharova A.A., Cherepanova E.A., Dedkov V.G., Totolian A.A.

ARVI PATTERN IN THE NORTHWEST FEDERAL DISTRICT DURING THE COVID-19 PANDEMIC (2021–2022) 917

Tyukavkina S.Yu., Kharseeva G.G., Kostinov M.P., Alieva A.A., Balakhnova V.V., Alutina E.L., Chaikina V.A., Volkova V.V.

THE FREQUENCY OF DETECTED PATHOGEN GENOMES IN CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS 927

Popkova M.I., Filatova E.N., Minaeva S.V., Sakharov N.A., Utkin O.V.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN EPSTEIN–BARR VIRUS MAJOR TYPES AND GENOVARIANTS AS WELL AS CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN HIV-INFECTED ADULTS 936

Komissarova D.V., Larina I.M., Pastushkova L.H., Kashirina D.N., Usanova N.A., Ilyin V.K.

RELATIONSHIP BETWEEN *E. COLI*, *ENTEROBACTER* spp. AND *S. AUREUS* ISOLATED FROM INTESTINAL MICROFLORA AND BLOOD PROTEINS ASSOCIATED WITH THE IMMUNE SYSTEM AND INFECTIOUS DISEASES DURING 3-DAY DRY IMMERSION 951

Andreeva I.S., Morozova V.V., Kabanov A.S.

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF RESISTANCE TO ANTIMYCOTIC FACTORS IN YEAST CLINICAL ISOLATES DURING RESPIRATORY DISEASES 961

Zamyatina E.V., Shevela A.I., Mandel I.A., Sizov A.A., Stepanov A.A., Sizov D.A., Danilenko S.O.

TOTAL IMMUNOGLOBULIN E AS A ZOOANTHROPOSONIS PREDICTOR IN HEALTHY VOLUNTEERS: AN OBSERVATIONAL STUDY 971

Zagdyn Z.M., Zudin A.B., Kobesov N.V., Vasileva T.P., Galoyan A.S., Verbitskaya E.V.

STRUCTURED TB RISK FACTORS IN REGIONS WITH LOW AND HIGH POPULATION DENSITY 981

Ullah J., Aziz A., Ullah A., Ullah I., Jabbar A., Umair M., Ullah M., Ullah H., Ullah M., Ali I.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS AND VIRULENCE DETERMINANTS OF CLINICAL ENTEROCOCCUS ISOLATES IN PAKISTAN 995

Elharrif M.G., Hassan N.A., Sharaf M.

BIOSYNTHESIS OF NOVEL MnO₂ NANOCAPSULES VIA <i>C. SPINOSA</i> EXTRACT AND HONEYBEE-DERIVED CHITOSAN: EXPLORING ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER PROPERTIES	1003
--	-------------

Short communications

Zharinova N.V., Serdyuk N.S., Zhilchenko E.B., Karapetyan M.G., Belozyorova O.N.

STUDYING THE BACTERICIDAL EFFECT OF COMMERCIAL DISINFECTANTS ON BRUCELLA	1017
---	-------------

Arakelyan R.S., Karpenko S.F., Rasevich Yu.I., Ismailov P.E.

2019 MEASLES MORBIDITY ASSESSMENT IN ADULT POPULATION OF THE ASTRAKHAN REGION. A RETROSPECTIVE ANALYSIS	1021
--	-------------

For the physicians

Seitopoulou C., Stamouli M., Kalliora G., Mourtzikou A.

URINARY TRACT INFECTION BY <i>STREPTOCOCCUS EQUINUS</i>: A PEDIATRIC CASE PRESENTATION	1026
---	-------------

Jubilee

FOR THE ANNIVERSARY OF VLADIMIR A. CHERESHNEV	1031
--	-------------

Instructions to Authors	1033
--------------------------------------	-------------

Author index	1036
---------------------------	-------------

Subject index	1036
----------------------------	-------------

ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА ГРИППА В: РАЗНООБРАЗИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СКВОЗЬ ПРИЗМУ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

И.В. Киселева¹, Н.В. Ларионова¹, А.И. Желтухина²

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Хотя история существования вирусов гриппа насчитывает не одну тысячу лет, первый вирус гриппа человека (вирус гриппа А) был открыт только в 1933 г., когда в арсенале вирусологов появились адекватные модели и субстраты для выделения вирусов; вслед за ним был выделен вирус гриппа В и несколько позднее — вирус гриппа С. Наиболее быстро эволюционируют вирусы гриппа А. Вирусы гриппа В мутируют в 2–3 раза медленнее и самые консервативные — вирусы гриппа С. С момента выделения и до конца 1970-х гг. антигенная эволюция у вирусов гриппа В проходила плавно, выделяемые штаммы генетически были достаточно однородны. В 1970–1980-х гг. произошла дивергенция вирусов гриппа В на две генетические линии, названные в честь референс-вирусов как «линия В/Victoria/2/87-подобных вирусов» и «линия В/Yamagata/16/88-подобных вирусов». Какое-то время вирусы, принадлежащие линии В/Yamagata, были широко распространены по всему миру, в то время как ареал циркуляции вирусов линии В/Victoria ограничивался Восточной Азией. Затем вирусы викторианской линии начали триумфальное шествие по земному шару. С этого момента обе линии вируса гриппа В циркулировали совместно с доминированием той или другой линии в разных регионах и разных эпидемиологических сезонах. Позднее во многих странах господствовала линия В/Yamagata, но к началу пандемии COVID-19 уже преобладали викторианские вирусы. Тогда же были выявлены последние представители линии В/Yamagata. На сегодняшний день линия В/Yamagata настолько исчезла из циркуляции, что Всемирная организация здравоохранения пришла к выводу, что ее включение в состав гриппозных вакцин штаммов больше не является оправданным. Определяющую роль в эволюции вирусов несомненно играет антигенная изменчивость. Она сопровождается фенотипической изменчивостью, то есть изменением биологических характеристик, которые в той или иной мере определяют способность вируса к самосохранению. Каким бы антигенно новым не был очередной вариант вируса гриппа, он будет обладать определенным набором биологических свойств, комбинация которых позволит возбудителю наилучшим образом выживать в организме чувствительного хозяина. В настоящем обзоре мы суммировали информацию о наиболее ярких биологических свойствах вирусов гриппа В, таких как чувствительность и устойчивость к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови, рецепторная специфичность гемагглютинаина и его термостабильность, чувствительность к низким значениям рН, температурочувствительность репродукции.

Ключевые слова: грипп, эволюция, вирусы гриппа В, биологические свойства.

Адрес для переписки:

Киселева Ирина Васильевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-68-60, 8 911 224-74-62. Факс: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

Contacts:

Irina V. Kiseleva
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-68-60, +7 911 224-74-62. Fax: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

Для цитирования:

Киселева И.В., Ларионова Н.В., Желтухина А.И. Эволюция вируса гриппа В: разнообразие биологических свойств сквозь призму генетической изменчивости // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 845–861. doi: 10.15789/2220-7619-IBV-17624

Citation:

Kiseleva I.V., Larionova N.V., Zheltukhina A.I. Influenza B virus evolution: diversity of biological properties through the prism of genetic variability // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 845–861. doi: 10.15789/2220-7619-IBV-17624

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-25-00070.
This work was supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 23-25-00070.

© Киселева И.В., Ларионова Н.В., Желтухина А.И., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IBV-17624>

INFLUENZA B VIRUS EVOLUTION: DIVERSITY OF BIOLOGICAL PROPERTIES THROUGH THE PRISM OF GENETIC VARIABILITY

Kiseleva I.V.^a, Larionova N.V.^a, Zheltukhina A.I.^b

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Although the history of the influenza virus existence goes back thousands of years, the first human influenza A virus was discovered only in 1933, when proper models and substrates for virus isolation became available; then the influenza B virus was isolated and, some later, the influenza C virus. Influenza A viruses evolve most rapidly. Influenza B viruses mutate 2–3 times slower, with influenza C viruses being most conservative. From the moment of isolation until the end of the 1970s, the antigenic evolution of influenza B viruses proceeded smoothly; the isolates were genetically quite homogeneous. In the 1970s–1980s, influenza B viruses diverged into two genetic lineages, “B/Victoria/2/87-like virus lineage” and the “B/Yamagata/16/88-like virus lineage”. For some time, B/Yamagata lineage viruses were widespread throughout the world, while the circulation area of B/Victoria viruses was limited to East Asia. Then the Victorian lineage began its triumphal march across the globe. From this moment on, both lineages of influenza B virus circulated together, with dominance of one or the other lineage in different geographic regions and different epidemiological seasons. Later, the B/Yamagata lineage dominated in many countries, but by the onset of the COVID-19 pandemic, Victorian viruses were already dominant. At the same time, the last representatives of the B/Yamagata lineage were identified. Today, the B/Yamagata lineage has disappeared from circulation and the WHO has concluded that its inclusion in influenza vaccine strains is no longer necessary. Antigenic variability undoubtedly plays a decisive role in the virus evolution. It is accompanied by changes in biological characteristics that, to one degree or another, determine the virus’s ability to self-preserve. No matter how antigenically new a next influenza virus variant is, it will bear a certain set of biological properties, the combination of which will allow the pathogen to best survive in sensitive host. In this review, we have summarized information on the most striking biological properties of influenza B viruses, such as sensitivity to nonspecific blood serum inhibitors, hemagglutinin receptor specificity, its thermostability, sensitivity to low pH values, and temperature sensitivity of reproduction.

Key words: influenza, evolution, influenza B viruses, biological properties.

Введение

Биологическая эволюция любых живых организмов и их сообществ носит поступательный и направленный характер. Ее ход необратим. Это в полной мере относится и к вирусам, что, кстати, льет воду на мельницу вечного спора между сторонниками теории того, что вирусы являются живыми организмами [26, 35, 59, 139] и их противниками [98]. Вирусы устаревшей антигенной структуры исчезают из циркуляции. А если в очень редких случаях возвращаются, как это случилось в 1977 г., когда вирусы гриппа А(H1N1) вызвали пандемию «русского гриппа», то природа этого явления до сих пор не известна. Не исключено, что такое нарушение привычных законов эволюции является рукотворным и связано со случайным заносом вируса в человеческую популяцию из лаборатории. Ряд вирусологов, в том числе Kilbourne [68], называют «русский грипп» 1977 г. «псевдопандемией». Из-за неясности происхождения возбудителя и относительно низкой смертности (около 700 тыс. летальных исходов) ВОЗ официально не признает пандемию русского гриппа А(H1N1) 1977–1978 гг. пандемией и считает, что мир пережил только 4 вирусологически документированные гриппозные пандемии — «испанку» 1918–2020 гг., «азиатский грипп» А(H2N2) 1957–1958 гг., «гонконгский

грипп» А(H3N2) 1968–1969 гг. и «свиной грипп» А(H1N1) pdm09 2009.

Что касается вирусов гриппа В, такого «отката» назад к вирусам устаревшей антигенной структуры зарегистрировано не было. После расхождения в 1980-х гг. двух генетических линий В/Victoria/2/87- и В/Yamagata/16/88-подобных вирусов [152], каждая из них независимо друг от друга продолжала свое поступательное эволюционное развитие, пока в 2020 г., вскоре после начала пандемии COVID-19, В/Yamagata-линия практически не исчезла из циркуляции [73]. Причины такого исчезновения на сегодняшний день не ясны.

Эволюция же биологических характеристик вирусов подчиняется несколько иным закономерностям. Для подавляющего большинства биологических признаков вируса известны только два варианта — «да» и «нет», которые с определенной периодичностью сменяют друг друга. Например, вирусы либо ингибиторостойчивы, либо ингибиторочувствительны; они либо способны размножаться за верхними и/или нижними пределами температурного оптимума, либо нет, и т. д. Если воспользоваться терминологией физики твердого тела, то при поступательном характере эволюции антигенной структуры вирусов (поступательное движение), изменение их биологических признаков происходит колебательно (колебательное движение) (рис.).

К сожалению, объем исследований, посвященных вирусам гриппа В, существенно отстает от изучения вирусов гриппа А. В одной только поисковой системе по биомедицинским исследованиям PubMed насчитывается в 10 раз меньше ссылок на вирусы гриппа В по сравнению с вирусами гриппа А. Хотя эволюции вирусов гриппа, в том числе вирусов гриппа В, посвящено немало статей, практически нигде не проводилась параллель между генетической изменчивостью вируса и изменением его фенотипических признаков. В настоящем обзоре мы собрали доступную литературу по наиболее ярким свойствам вирусов гриппа В, таким как устойчивость к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови, рецепторная специфичность гемагглютинаина (НА), температурочувствительность репродукции, термочувствительность гемагглютинаина и чувствительность к низким значениям рН. Помимо этого, мы попытались оценить характер изменения этих признаков в процессе эволюционирования.

Эволюция эпидемических вирусов гриппа В

История существования вирусов гриппа насчитывает не одну тысячу лет [132], но первый вирус гриппа В был открыт только в 1940 г. [49, вслед за вирусом гриппа А человека [131]. Последним среди вирусов гриппа человека был установлен вирус гриппа С [135]. Вирусы гриппа А эволюционируют наиболее быстро. Вирусы гриппа В мутируют в 2–3 раза медленнее и самыми консервативными являются вирусы гриппа С [105, 150]. В отличие от широко распространенных в природе вирусов гриппа А, первичным хозяином и резервуаром вирусов гриппа В является человек [65]. И хотя вирусы гриппа В способны передаваться от людей другим биологическим видам [53, 80, 106, 108], это скорее исключение, чем правило.

Со времени выделения и до конца 1970-х гг. антигенная эволюция у вирусов гриппа В проходила линейно, с постепенным накоплением мутаций, позволяющих уклоняться от усиливающегося в популяции иммунитета. Выделяемые вирусы гриппа В генетически были достаточно гомогенны. В 1970–1980-х гг. от основной линии отделилась ветвь вирусов [152], которая сначала представлялась мало перспективной в плане дальнейшего широкого распространения, но ее появление ознаменовало начало дивергенции вирусов гриппа В на две генетические линии, названные в честь вирусов-родоначальников как линия В/Victoria/2/87-подобных вирусов и линия В/Yamagata/16/88-подобных вирусов (викторианская и ямагатская линии соответственно) [67].

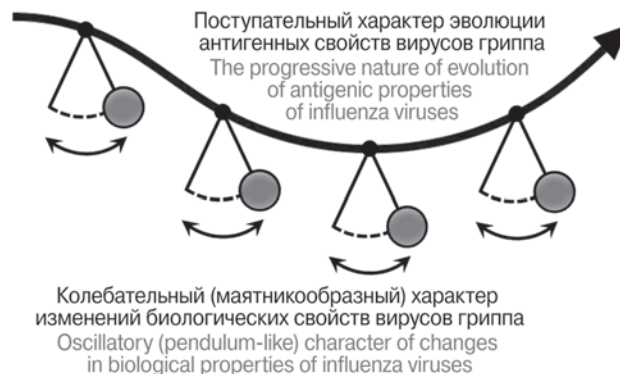


Рисунок. Характер эволюции антигенных и биологических свойств вирусов гриппа

Figure. The evolution pattern for influenza virus antigenic and biological properties

С начала 1980-х гг. наблюдалась совместная или попеременная циркуляция двух антигенно разошедшихся линий вируса гриппа В [18], которые, наряду с вирусами гриппа А, зачастую являлись возбудителями тяжелых заболеваний [58, 119, 152].

С 1990 по 2001 гг. в Европе, Америке, Африке и Австралии циркулировали практически только штаммы линии В/Yamagata. Последний раз штамм этой линии (В/Sichuan/379/99) был рекомендован ВОЗ для включения в состав вакцин в эпидемическом сезоне 2001–2002 гг. (в производстве вакцин использовались вирусы В/Johannesburg/5/99 или В/Victoria/504/2000) [146]. В то же время география циркуляции викторианских вирусов была ограничена странами Юго-Восточной Азии [42, 115, 119]. Широкого распространения они не имели.

Затем в течение сезонов 2000–2001 и 2001–2002 гг. вирусы викторианской линии появились в Северной Америке и Европе и мигрировали по всему миру [128].

С 2000-х гг. две линии гриппа В совместно циркулируют с постоянной изменчивостью с точки зрения географического распространения и геномной эволюции [77, 94, 128]. При этом в Северо-Американском регионе циркулировала одна ветвь викторианских вирусов, а в Китае и Юго-Восточной Азии были локально распространены две другие ветви вирусов линии В/Victoria. Эти три ветви эволюционировали независимо, не покидая регион начальной локализации на протяжении пяти лет, что к 2007–2008 гг. привело к одновременной циркуляции трех антигенных вариантов (линий) викторианских вирусов в различных частях планеты [22]. Несколько позднее викторианские вирусы стали активно распространяться по миру и социркулировать с превалирующими ранее В/Yamagata/16/88-подобными вирусами [119].

Следствием совместной циркуляции двух линий вируса гриппа В стало появление реассортантов, обладающих НА линии В/Victoria и NA линии В/Yamagata (а именно — В/Sichuan-подобных вирусов) или наоборот [82, 94, 136]. Подобная реассортация (как и для вирусов гриппа А) может приводить к самым непредсказуемым последствиям, поскольку реассортанты могут приобретать новые, несвойственные родителям свойства вплоть до возникновения нового, высоковирулентного вируса [148].

В 2003–2004 гг. опять в циркуляцию вернулись вирусы линии В/Yamagata, которые антигенно отошли от последнего эталонного штамма из этой группы — В/Sichuan/379/99.

На протяжении эпидемического сезона 2004–2005 гг. циркулировали вирусы гриппа В как ямагатской, так и викторианской линий, но соотношение представителей этих двух эволюционных групп отличалось для разных стран [3, 81, 101]. В России 2004–2005 гг. представители ямагатской и викторианской линий встречались примерно с равной частотой, затем, в сезонах 2005–2006 и 2006–2007 гг., викторианские вирусы получили широкое распространение и вытеснили из циркуляции вирусы линии В/Yamagata [5, 11]. Однако в 2007–2008 гг. в России снова начала превалировать ямагатская линия [4, 11], с 2008 по 2011 гг. возобновилась активная циркуляция викторианской линии, а затем была снова отмечена совместная циркуляция вирусов гриппа В викторианской и ямагатской линий [11].

Одновременная циркуляция вирусов обеих антигенных ветвей отмечалась вплоть до 2010–2012 гг. [2, 4, 5, 8, 13, 23, 24, 29, 41, 42, 99, 115, 120, 153], но в определенных регионах мира превалировала либо та, либо другая линия [11, 119, 152]. Так, например, в сезоне 2011–2012 гг. вирусы линии В/Yamagata впервые появились на Тайване, тогда как викторианские вирусы преобладали в Китае и циркулировали еще в некоторых регионах мира [144]. Похожая ситуация наблюдалась в том же сезоне в Австралии, где доминировала викторианская линия, и в Новой Зеландии, где в то же время доминировала линия В/Yamagata [138].

Позднее во многих странах продолжала доминировать линия В/Yamagata [39], а в сезон 2017–2018 гг. первенство прочно захватили ямагатские вирусы [45, 46]. В 2019 г. по всему миру регистрировались дрейф-варианты внутри обеих линий. В 2020 г. уже преобладали вирусы викторианской линии, но еще выявлялись последние к настоящему времени представители линии В/Yamagata [12, 111].

Закономерности глобальной циркуляции вирусов гриппа В пока изучены не в полной мере. Они отличаются от закономерностей циркуля-

ции вирусов гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1), которые также не схожи между собой. Chen et al. [32], проанализировав филогенетические закономерности эволюции всех сегментов генома более 100 вирусов гриппа В, выделенных с 1965 г., предположили, что эволюционные изменения среди антигенно различных линий В/Yamagata и В/Victoria являются результатом изменений в коллективном иммунитете, а взаимодействие с вирусом гриппа А может играть центральную роль в формировании эволюционной динамики вируса гриппа В, способствуя смене доминирования между линиями В/Victoria и В/Yamagata.

Основным способом борьбы с гриппозной инфекцией остается вакцинопрофилактика. Вакцинные штаммы для гриппозных вакцин меняются в соответствии с ежегодными рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). До 2012 г. сезонные гриппозные вакцины были трехвалентными, то есть включали три штамма вирусов гриппа — один штамм А(Н1N1), один штамм А(Н3N2) и один штамм В линии либо В/Yamagata, либо В/Victoria. Но уже в 1999 г., при вынесении рекомендаций о составе гриппозных вакцин, у ВОЗ впервые возникла проблема выбора между двумя линиями вируса гриппа В. Проблема оказалась настолько серьезной, что дважды (на сезон 1999–2000 гг. для Северного полушария и на сезон 2000 г. для Южного полушария) ВОЗ рекомендовала одновременно два вируса гриппа В (В/Shangdong/7/97 как представителя линии В/Victoria и В/Beijing/184/93 как представителя линии В/Yamagata). Решение о том, какой из них является более подходящим для включения в трехвалентную вакцину, было отдано на рассмотрение национальных контролирующих органов и принималось на основе местных эпидемиологических данных [146].

К сожалению, из-за постоянного появления антигенно новых штаммов эффективность рекомендованных ВОЗ кандидатов в вакцины не гарантируется; половина прогнозов на 1999–2021 гг. была признана неоптимальной. Например, в сезоне 1997–1998 гг. было замечено значительное несоответствие между компонентом вакцины А(Н3N2) и наиболее распространенным эпидемическим вирусом гриппа А(Н3N2) [40]. В феврале 2019 г. ВОЗ сочла затруднительным своевременно рекомендовать вакцинный штамм подтипа А(Н3N2), и рекомендации по компоненту А(Н3N2) были отложены на целый месяц — до 21 марта 2019 г.

Эта проблема коснулась и В компонента вакцин. В ряде стран, включая и Россию, в эпидемическом по гриппу сезоне циркулировали штаммы вируса гриппа В, принадлежащие генетической линии, отличной от включенной в состав вакцин [23, 28, 60, 115, 133, 137].

Все это побудило производителей к созданию квадريفалентных вакцин, включающих оба компонента В, что должно было нейтрализовать несовпадение между циркулирующей линией и линией, рекомендованной в качестве вакцинной [23]. Оценив ситуацию с параллельной циркуляцией двух линий и практически полной невозможностью предугадать, какая линия будет превалировать в конкретном регионе, эксперты ВОЗ решили проблему, рекомендовав включить в вакцины вирусы гриппа В обеих линий. 23 февраля 2012 г. для тех, кто проживал в Северном полушарии и рассматривал возможность перехода на квадريفалентные препараты, ВОЗ впервые рекомендовала для включения в состав вакцин в сезоне 2012–2013 гг. вирусы обеих линий [146]. Для Южного полушария первые рекомендации по квадринакцине были сделаны 20 сентября 2012 г. [146].

В начале 2020 г. вирусы линии В/Yamagata стали значительно реже появляться в циркуляции, а в марте месяце викторианские вирусы практически полностью вытеснили линию В/Yamagata [73, 145]. Сегодня, через 11 лет после выхода первых рекомендаций ВОЗ по квадринакцине, линия В/Yamagata настолько исчезла из циркуляции [73], что встал вопрос о возвращении к тривалентной вакцине [145]. В октябре 2023 г. ВОЗ пришла к выводу, что защита от линии В/Yamagata больше не требуется и ее включение в гриппозные вакцины больше не является оправданным. Это снова сократило количество штаммов, входящих в состав гриппозных вакцин, до трех [145].

Предсказать долгосрочную эволюцию вирусов гриппа невозможно. Пока неясно, появятся ли вирусы В/Yamagata снова, возникнет ли новая, кардинально отличающаяся линия или будет эволюционировать только линия В/Victoria. В 2020 г. Virk и соавт. [140] предположили, что дальнейшее расхождение вариантов гемагглютинина с плохой перекрестной реактивностью потенциально может привести к циркуляции трех или более различных линий вируса гриппа В. Исчезновение в это же время линии В/Yamagata вызвало бурные споры о причинах этого явления, однако предположение о том, что исчезновение ямагатских вирусов может быть следствием мер по борьбе с коронавирусом, пока не подтверждено документально.

Ингибиторостойчивость

Генетическая дивергенция вирусов гриппа В на две линии привела к изменениям, иногда кардинальным, целого ряда их биологических (фенотипических) свойств, наиболее ярким из которых является так называемая устойчивость к ингибиторам нормальной (неиммун-

ной) сыворотки крови лошади. Ингибиторы относятся к факторам неспецифической защиты организма от инфекционных заболеваний. С 1960-х гг. в литературе стали появляться сообщения о вирусах гриппа А и В, как чувствительных, так и устойчивых к действию ингибиторов сыворотки крови [21, 36, 56, 75, 84]. Ингибиторы могут неспецифически подавлять гемагглютинацию вирусов гриппа, что в лабораторных условиях четко проявляется в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

До 1980-х гг. большинство изолятов вирусов гриппа В обладало ингибиторорезистентным фенотипом. После разделения на две линии, несмотря на то что в антигенном отношении викторианские вирусы далеко отошли от вирусов гриппа В прошлых лет [119], они сохранили высокий уровень устойчивости к ингибиторам. Вирусы линии В/Yamagata, напротив, сохраняя большее филогенетическое родство с «ранними» вирусами, приобрели высокую ингибиторочувствительность [9].

Этому признаку уделялось сравнительно мало внимания до тех пор, пока в 1990-х гг. не выяснилось, что так называемая чувствительность/устойчивость к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови напрямую связана с сиаловыми рецепторами клетки хозяина [124]. Тогда старые работы 1960–1970-х гг. [21, 36, 75, 84] приобрели совершенно новое звучание; нужно было только заменить термин «чувствительность/устойчивость к ингибиторам» на «чувствительность/устойчивость к специфическим альфа-2,3 или альфа-2,6-сиаловым рецепторам».

Рецепторная специфичность гемагглютинина

Начальной стадией репликационного цикла является адсорбция вирусного гемагглютинина на поверхности клетки-хозяина [129]. Вирус гриппа распознает N-ацетилнейраминовую (сиаловую) кислоту клеточной мембраны в качестве рецептора. Сиаловые кислоты представляют собой девять углеродных моносахаридов, обнаруженных на концах многих гликоконъюгатов. Они широко распространены в различных типах животных клеток. Второй углерод концевой сиаловой кислоты может связываться либо с третьим, либо с шестым углеродом галактозы, образуя связи Sia α -2,3Gal (α -2,3) или Sia α -2,6Gal (α -2,6) соответственно. Различия в способе связывания приводят к уникальным стерическим конфигурациям концевой сиаловой кислоты. Эти группы сиаловой кислоты распознаются сайтами связывания рецепторов НА вируса гриппа, которые обладают специфичностью к связям α -2,3 или α -2,6. Вирусы

гриппа А человека распознают в качестве клеточных рецепторов гликопротеины, содержащие сиаловые кислоты, связанные с галактозой через связь α -2,6 [37, 51, 90, 118]. Такие сиалилсодержащие рецепторы преобладают на эпителиальных клетках верхних дыхательных путей человека [38, 92, 130]. Вирусы птичьего и лошадиного гриппа преимущественно связываются с α -2,3-рецепторами [37, 51, 90, 118], которые, в частности, преобладают на эпителиальных клетках кишечника водоплавающих птиц [91, 134]. Вирусы свиного гриппа проявляют сродство к обоим типам рецепторов [142]. Эти различия в рецепторной специфичности НА являются решающим фактором, определяющим круг хозяев вирусов гриппа [25, 147].

Что касается вирусов гриппа В, практически эндемичных для человека, то вирусы линии В/Yamagata обладают преимущественным сродством к рецепторам с α -2,6-связью, тогда как вирусы линии В/Victoria могут связываться с обоими типами рецепторов — со связью α -2,6 и α -2,3, что и объясняет чувствительность к ингибиторам сыворотки крови лошади первых и устойчивость вторых. Кроме того, для их представителей специфичен третий тип рецепторов — сульфатированные гликопротеины [141].

Зондирование вирусов неогликоконъюгатами выявило специфическое свойство связывания 6'-HSO₃LaсNAs (но не других сульфатированных олигосахаридов) штаммов вируса гриппа А и В человека [116].

Рецепторсвязывающая активность НА вирусов гриппа может ингибироваться различными молекулами, присутствующими в сыворотке и слизистых секретах.

Наиболее хорошо исследованы Sia α -2,6Gal-терминированные α 2-макроглобулины как ингибиторы, присутствующие в сыворотке крови лошади. Они экспрессируют модифицированную 4-О-ацетил-N-ацетилнейраминную кислоту, которая устойчива к гидролизу вирусной нейраминидазой и действует как мишень для связывания гемагглютинаина [114]. Эти лектины имитируют рецепторы клетки с α -2,6 типом связи, они блокируют сайт связывания рецептора вирусного НА и таким образом избирательно ингибируют вирусы гриппа человека [50, 85, 89]. Соответственно, для вирусов гриппа человека характерна чувствительность к сывороточным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади, тогда как вирусы гриппа птиц и лошадей, преимущественно распознающие α -2,3 рецепторы, устойчивы к ингибиторам лошадиной сыворотки [75, 89, 117].

Неиммунная сыворотка крови лошади является удобным инструментом для лабораторного анализа рецепторной специфичности вирусов гриппа в РТГА и в реакции нейтрализации.

Однако, являясь сильным ингибитором гемагглютинирующей и инфекционной активности многих H2 и H3 вирусов человека, она не ингибировала ранние вирусы гриппа В и вирусы H1N1, что может объясняться их двойственной α -2,3/ α -2,6 рецепторной специфичностью.

Было проведено сравнение 22 аминокислотных последовательностей НА устойчивых и чувствительных к ингибиторам вирусов гриппа В линии В/Victoria и В/Yamagata, полученных из международных баз данных [57, 104] и выровненных с помощью компьютерной программы Clone Manager 9 for Windows. Установлено наличие по меньшей мере трех уникальных аминокислотных позиций в молекуле НА1, которые могут быть связаны с приобретением ингибиторочувствительности вирусами линии В/Yamagata: Lys-86-Met; Asn-163-Ser, Lys-224-Asn (Ларионова Н.В. и Киселева И.В., личное сообщение). Все выявленные аминокислотные замены находятся вблизи антигенного сайта: аминокислотные остатки 86 и 224 расположены в непосредственной близости от антигенного сайта НА, а 163 остаток находится в 160 петле. Ни одна из выявленных аминокислотных замен не затрагивает напрямую рецепторсвязывающий сайт, но все они находятся недалеко от него. Аминокислотная замена в позиции 163, как возможная детерминанты рецепторной специфичности, описана также в работе Wang и соавт. [41]. Консервативная позиция Asn-163 у вирусов линии В/Victoria является сайтом гликозилирования, а у вирусов линии В/Yamagata она утрачена вследствие делеции.

Клиническая картина заболеваний, вызываемых вирусами гриппа В, варьирует от легкой инфекции верхних дыхательных путей до тяжелой пневмонии [31, 33]. Вирусы гриппа В линии В/Victoria, адсорбирующиеся на сиалилсодержащих рецепторах обоих типов и на сульфатированных олигосахаридах, скорее могут быть причастны к тяжелым инфекциям с развитием бронхопневмоний и желудочно-кишечных заболеваний, чем вирусы линии В/Yamagata, прикрепляющиеся только к Sia α -2,6Gal гликопротеинам верхних дыхательных путей [41].

Температурочувствительность репродукции

Одним из факторов успешной репродукции эпидемических вирусов гриппа является их широкая приспособляемость к температурному диапазону функционирования организма хозяина.

Первые вирусы гриппа человека А и В, выделенные на заре своего открытия, активно размножались при температурах, превышающих оптимальные для их репродукции значения (32–36°C), то есть обладали так называемым

non-ts (non-temperature sensitive, температуроустойчивым) фенотипом. Многочисленные свидетельства привели к однозначному заключению о том, что циркулирующие вирусы гриппа человека всегда обладают устойчивостью к повышению температуры инкубации, что определяет их вирулентность, позволяя успешно противостоять неспецифическим факторам защиты организма [17]. Было установлено, что предельно допустимая верхняя ограничительная температура репродукции вирусов гриппа А в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) — 40°C, а у вирусов гриппа В — 38°C. Мнение о том, что все эпидемические вирусы гриппа представлены температуроустойчивыми вариантами, бытовало вплоть до конца 1970-х гг., пока в циркуляции не появились первые со времени открытия вирусов гриппа ts-варианты (temperature sensitive, температурочувствительные) сначала вирусов гриппа А [16, 110], а позже и В [9, 79]. В эпидемический период 1977–78 г. 17 из 26 изолятов сероподтипа А(Н1N1) и 2 из 11 изолятов А(Н3N2) имели ts-фенотип. При этом вирусы, выделенные в одном городе и даже от одного индивидуума, значительно варьировали по признаку температурочувствительности. Изолят А(Н1N1) с температурой репродукции в МДСК, ограниченной 38°C, оказался частично аттенуированным для человека. Ts-мутант, с ограничительной температурой репродукции 37°C, проявил себя еще более аттенуированным в тесте на волонтерах, тогда как изолят с предельно допустимой температурой репродукции 39°C был значительно более реактогенным [34, 110]. Был сделан вывод о том, что появление в природе вирусов с ts-фенотипом, наряду с non-ts, означает, что вирусы варьирующей вирулентности даже из одного сероподтипа, естественно социркулируют в сообществе [110]. Дальнейшие исследования обнаружили, что пропорция ts-вирусов неуклонно возрастала с годами наблюдения. Так, если в 1949–1957 гг. ts-вирусы составляли 8,3% от всех исследованных изолятов циркулировавших в тот пандемический сезон вирусов гриппа сероподтипа А(Н1N1), то в 1979–1980 гг. они составили 82,4% популяции активных в тот эпидемический период вирусов А(Н3N2) [34].

В молекулярно-генетических исследованиях вирусов гриппа А человека, птиц и реассортантов между ними чувствительность к температуре репликации была обусловлена мутациями в белке полимеразного комплекса PB2 [54, 55, 88, 93]. Для вирусов гриппа В подобных исследований не проводилось, однако в пользу определяющей роли белков полимеразного комплекса в температурочувствительности/устойчивости репродукции вирусов гриппа как А, так и В свидетельствует молекулярно-

генетический анализ доноров аттенуации для живых гриппозных вакцин, полученных за счет холодовой адаптации эпидемических вирусов к репродукции в РКЭ при пониженной до 25°C температуре и реассортантных штаммов между эпидемическими вирусами гриппа А и В и донорами аттенуации для вакцин Ультравак® (НПО Микроген, Россия) и FluMist® (США) [6, 70].

Анализ литературных данных позволяет согласиться с заключением, что существует определенная цикличность проявления ts-признака у вирусов гриппа [7, 79].

Частота выделения ts эпидемических вирусов варьирует в зависимости от периода их циркуляции. Прослеживается следующая волнообразная закономерность: каждый новый цикл открывается появлением в циркуляции антигенно новых non-ts-штаммов, которые затем сменяются штаммами, обладающими ts-фенотипом [7]. При этом наибольшее число волн было зафиксировано для самых быстро эволюционирующих вирусов гриппа — А(Н3N2). Существенно меньше подобных волн было отмечено для менее лабильных вирусов гриппа А(Н1N1) и еще меньше — для вирусов гриппа В. Отмечено появление только одной волны преобладания температурочувствительных вирусов гриппа В, которое началось в конце 1990-х гг. и продолжается до сих пор. Возможно, это связано с большей адаптацией вируса гриппа В к человеческой популяции из-за его более древнего происхождения [132], в результате чего он сохраняет на протяжении долгих лет определенную преэместивность как своих антигенных, так и фенотипических признаков.

Было установлено, что ранние штаммы вирусов гриппа В: В/Lee/40, В/Душанбе/62/66 и В/СССР/69 (Ларионова Н.В., Киселева И.В., личное сообщение), как и другие описанные в литературе штаммы этого периода выделения — В/95/59 [14], В/Ann Arbor/1/66 [86], В/2/67 [71], В/Hong Kong/8/73 [97] проявляли нечувствительность к повышенной температуре инкубации.

Анализ штаммов, выделенных в период с 1986 по 1998 гг., показал, что 6 из 10 вирусов обладали non-ts-фенотипом. Это 3 штамма линии В/Victoria (В/Ann Arbor/1/86 [20], В/Victoria/2/87, В/Shangdong/7/97) и 3 штамма линии В/Yamagata (В/Beijing/203/89, В/Harbin/07/94 и В/Yamanashi/166/98). Остальные штаммы линии В/Victoria (В/Ann Arbor/2/86 [15], В/Рига/3968/86, В/СССР/3/87) и штамм линии В/Yamagata (В/Петербург/92/95) оказались чувствительными к повышенной температуре. Таким образом, признак температурочувствительности вирусов 1980–1990-х гг. выделения проявлял мозаичность с небольшим преобладанием устойчивых к повышенной температуре инкубации штаммов (60% составляли штаммы, обладающие non-ts-фенотипом, и 40% — ts-фенотипом) [9].

Вирусы 1990–2001 гг. выделения, которые относились к линии В/Yamagata: В/Tokyo/53/99, В/Johannesburg/05/99, В/Shanghai/72/99, В/Arkhangelsk/312/99, В/Sichuan/379/99, В/Oakland/1/2000, В/Mexico City/84/2000, В/Guangdong/120/2000 и В/Victoria/504/2000 обладали выраженным ts-фенотипом, плохо размножаясь при повышенной температуре инкубации. Позже температуроустойчивые вирусы вновь появились среди вирусов гриппа В: В/Massachusetts/2/2012 (линия В/Yamagata), В/Texas/02/2013 (линия В/Victoria). Приведенные данные свидетельствуют о наличии определенной цикличности изменения ts-признака среди вирусов гриппа В. Если штаммы 1940–1970-х гг. выделения в подавляющем большинстве представляли собой температуроустойчивые варианты, то группа вирусов 1999–2001 гг. выделения включает в себя исключительно температурочувствительные штаммы. Промежуток времени с начала 1980-х до конца 1990-х гг., когда в циркуляции одновременно находились как вирусы, обладающие как ts, так и non-ts-фенотипом, можно рассматривать как некий переходный период от температурорезистентных к температурочувствительным вирусам (Ларионова Н.В., личное сообщение).

Причина такой волнообразной изменчивости может заключаться в эволюционной задаче вируса, которая состоит в распространении в популяции [69]. Для реализации этой задачи вирусу, как паразиту, нет причины, и даже вредно, уничтожать хозяина, если вирус респираторным путем передачи способен стабильно распространяться в сообществе. Поэтому температурочувствительные вирусы продолжают длительно сохранять способность к циркуляции за счет респираторной трансмиссии.

Как допустимую вероятность можно рассматривать появление в результате эволюционного отбора новых температуроустойчивых вариантов, поскольку вирусы человека имеют генетический потенциал к проявлению non-ts-фенотипа, который усиливает патогенность вируса. Температуроустойчивый вирус, как более сильный патоген, широко распространяется, вытесняет ослабленные вирусы, но постепенно, с усилением в сообществе иммунной прослойки, эволюционирует в сторону появления менее вирулентных вариантов.

Эволюция температурочувствительности происходит параллельно с антигенной эволюцией, но независимо от нее. Отмечены факты циркуляции антигенно однородных вирусов, различающихся по температурочувствительности. Особенно тяжелые эпидемии возможны при сочетании антигенной новизны и non-ts-фенотипа.

В работе [78] на примере вирусов В/Ned/537/2005 (линия В/Yamagata) и В/Malaysia/2506/

2004 (линия В/Victoria) была сделана попытка понять механизм формирования температурочувствительного фенотипа вирусов гриппа В. Авторы предполагают, что точная настройка экспрессии белка НА в соответствии с температурой органов-мишеней организма хозяина может быть еще одной стратегией вирусной адаптации в дополнение к хорошо известным механизмам, связанным с использованием рецепторов, активностью полимеразы или ускользанием от иммунитета.

Возвращаясь к вопросу о эпидемиологическом значении двух линий вирусов гриппа В и о том, что в последние несколько лет вирусы линии В/Yamagata практически перестали циркулировать, стоит привести мнение Laporte и соавт. [78], показавших, что для активации расщепления НА0 и накопления гемагглютини-на в инфекционной форме у вирусов линии В/Victoria наблюдается более строгая зависимость от температуры 33°C и умеренной кислотности. Именно такие показатели присущи верхним дыхательным путям человека. Авторы считают, что оптимальная для вирусов В/Victoria сон-стройка с параметрами верхних дыхательных путей дает вирусам линии В/Victoria преимущества в сравнении с В/Yamagata-подобными вирусами.

Учитывая этот факт, объяснение исчезновения в 2020 г. вирусов гриппа линии В/Yamagata вследствие беспрецедентных противоэпидемических мер, развернутых для борьбы с COVID-19, представляется мало убедительным, потому что не объясняет избирательного исчезновения В/Yamagata-подобных вирусов при активной циркуляции других (риновирусы, вирусы гриппа H3N2, В/Victoria-подобные вирусы). А вот с точки зрения ослабления вирусов линии В/Yamagata их исчезновение становится более логичным.

Устойчивость репродукции к пониженной температуре

Ретроспективный анализ показал, что в течение последних 40–45 лет циркулировали не только температурочувствительные, но и природно-холодоустойчивые вирусы гриппа А и В, способные к репродукции в РКЭ при пониженной до 25°C температуре инкубации. Среди вирусов гриппа В холодоустойчивостью репродукции обладали, к примеру, вирусы линии В/Yamagata — В/Jilin/20/03 и В/Texas/06/11 [10]. Следует отметить, что эти вирусы не приобрели эпидемического значения.

Роль холодоустойчивости природных изолятов вирусов гриппа не исследована, однако сопоставление с селективно полученными ts/ca-донорами аттенуации А и В для живой

гриппозной вакцины [1] дает основания полагать, что са-фенотип «диких» вирусов, особенно в сочетании с температурочувствительностью, является опосредованным указанием на их сниженную вирулентность (естественную аттенуацию).

Локализация патогена в верхних дыхательных путях человека и неспособность проникнуть в нижние отделы респираторного тракта — это, вероятно, еще один механизм выживания вируса в популяции, иммунорезистентной за счет прошлых эпидемий и вакцинации, что дает вирусу еще какой-то шанс циркулировать в сообществе до возникновения нового антигенного варианта.

Термочувствительность гемагглютинина

Феномен термочувствительности/термостабильности гемагглютинина вируса гриппа. Впервые был описан в 1985 г. Scholtissek [126], который показал, что разные штаммы вируса гриппа А по-разному переносят нагревание до высоких температур. При этом одни вирусы сохраняли способность к гемагглютинации после 20-минутного нагревания при 54°C, а другие уже при 50°C полностью утрачивали гемагглютинирующую активность. С тех пор в литературе время от времени появляются отдельные публикации о термоустойчивости НА вирусов гриппа А [19, 103, 126]. Так, в экспериментах *in vivo* показана корреляция между уровнем термостабильности НА вируса гриппа А(H1N1) pdm09 и его патогенностью для лабораторных животных [19]. Наиболее патогенный для мышей вирус A/South Africa/3626/2013 A(H1N1) pdm09 сохранял активность НА даже при 60–65°C. Логично было бы предположить, что с точки зрения сохранения вида вирусу выгоднее иметь гемагглютинин, устойчивый к температурным воздействиям. Однако среди высокопатогенных вирусов гриппа птиц встречаются как термолабильные, так и термостабильные штаммы [122, 126]. На основании немногочисленных имеющихся данных пока трудно выявить эволюционную направленность и истинное биологическое значение признака термочувствительности гемагглютинина вируса гриппа, которое еще только предстоит определить.

Некоторые авторы пытались найти параллель между термочувствительностью гемагглютинина вируса гриппа А и чувствительностью вируса к низким значениям рН [30, 83, 102, 121, 122]. Эти два свойства вируса гриппа А иногда рассматриваются параллельно как факторы, обуславливающие стабильность НА в целом (см. следующий раздел).

Было показано, что стабильность НА коррелирует с его термостабильностью [121]. В качестве молекулярной основы стабильности НА предполагают наличие многочисленных аминокислотных остатков, расположенных по всему тримеру НА. При этом отмечают, что это свойство следует контролировать не генотипически, а фенотипически [123].

Относительно же вирусов гриппа В наблюдается практически полный провал в данных. Как ни удивительно, но в доступной литературе мы не нашли упоминаний об аналогичных исследованиях с вирусами гриппа В. Имеется единственная работа, в которой показано, что вирусы гриппа В в целом значительно менее стабильны в аэрозолях при 55%-ной относительной влажности окружающей среды, чем вирусы гриппа А(H3N2) [71]. Возможно, такое отсутствие информации объясняется тем, что вирусы гриппа В никогда не рассматривались как потенциальный источник пандемий, а именно стабильность НА ряд авторов позиционирует как необходимый момент для обеспечения пандемического потенциала вируса. Предполагают, что для оценки пандемического и патогенного потенциала вируса гриппа для людей следует учитывать не только специфичность связывания гликановых рецепторов, но и уровень стабильности НА [122].

Чувствительность к низкому уровню рН (< 5–6)

Безоболочечные вирусы экологически устойчивы к повышенным температурам и могут легко выдерживать сухую и кислую среду. Как правило, они хорошо размножаются в кислой среде. Напротив, сложноорганизованные вирусы с липидной оболочкой, такие как вирусы гриппа, РС-вирусы, SARS-CoV-2 чувствительны к нагреванию; кроме того, они разрушаются кислотами и детергентами, чувствительны к окислителям, липидным растворителям и УФ-облучению [43, 47, 48, 52, 61, 62, 63, 64, 66, 74, 76, 87, 96, 107, 109, 112, 113, 125, 143]. Это общие для всех сложноорганизованных вирусов, обладающих липидной оболочкой, физико-химические характеристики. Кроме экологического воздействия кислой среды на вирусную частицу, низкие значения рН необходимы для определенных этапов репликации вируса, причем этот механизм практически универсален и для вирусов гриппа А, и для вирусов гриппа В.

НА вирусов гриппа демонстрирует кислото-стабильность и предпочитает температуру около 33°C, что указывает на выраженную адаптацию к верхним дыхательным путям человека, где рН слегка кислый и температура более низкая, чем

в легких. Особенно четко температурозависимость проявляется у вирусов гриппа В [78].

Кислая среда ($\text{pH} < 5-6$) необходима для того, чтобы в эндосомах произошло слияние оболочки вируса гриппа и цитоплазматической мембраны эпителиальной хозяйской клетки. Под воздействием низких pH гомотримерный гликопротеин НА претерпевает конформационные изменения, которые опосредуют слияние вирусной оболочки с мембраной-мишенью [72]. Это является одним из первых этапов репродукции вируса [121]. Установлено, что в целом для активации НА вируса гриппа А характерен диапазон pH от 4,8 до 6,2 [122]. С другой стороны, существует некое пороговое значение pH , ниже которого происходит деградация НА. Этот пороговый уровень pH является штаммоспецифичным. После обработки различных штаммов при пониженном значении pH стабильность их НА и инфекционность снижаются [126, 127].

Под кислотостабильностью НА подразумевают такой уровень pH , при котором запускаются необратимые конформационные изменения. Если вирион подвергается воздействию достаточно низкого pH вне клетки-хозяина, белок НА преждевременно активируется, происходят необратимые конформационные изменения, в результате которых вирион инактивируется [123].

Стабильность НА стала важным фактором, определяющим круг хозяев для вируса гриппа, его инфекционность, трансмиссивность и пандемический потенциал для человека [95]. В ходе эндоцитоза происходит последовательное понижение pH в эндосомах и лизосомах (от 6,0–6,5 до 4,6–5,0) [95]. Расщепленный НА1/НА2 запускается низким pH , вызывая необратимые конформационные изменения, которые вызывают слияние мембран.

Если материалы об изучении стабильности инфекционного вируса гриппа А при низких значениях водородного показателя регулярно публиковались, начиная с 1980-х гг. [72, 121, 123, 126, 127, 149], то в доступной литературе нашлось только два упоминания чувствительности вирусов гриппа В к кислой среде [27, 100]. В работе Mould и соавт. [100] доказана необходимость активности ионного канала для «раздевания» вируса гриппа В в эндосомах. Установлено, что мембранный белок ВМ2 вируса гриппа В обладает активностью ионных каналов, а коэкспрессия ВМ2 с НА предотвращает изменения в конформации НА, индуцированные низким pH , во время транспорта к поверхности клетки. Обзорная статья Caffrey и Lavie [27] посвящена скорее не устойчивости/чувствительности вируса гриппа В при низком уровне pH , а высоко консервативному для всех

вирусов гриппа (не только А, но и В) триггерному механизму, посредством которого низкие значения pH запускают конформационные изменения НА.

К настоящему моменту прямая связь эволюционной изменчивости антигенной структуры вирусов гриппа с термостабильностью их НА и чувствительностью к кислой среде не установлена. Известно только, что повышение патогенности вируса гриппа птиц А(H5N1) для кур сопряжено с увеличением pH активации НА [44], а значительные различия в термостабильности НА среди разных штаммов гриппа А не коррелируют с различиями в их стабильности при низком pH [126].

Сочетание pH активации НА и pH инактивации вириона при значении ниже 5,6 было связано с адаптацией человека. Полагают, что оба свойства (термостабильность гемагглютинина и чувствительность к низким значениям pH следует учитывать в алгоритмах оценки риска пандемического потенциала вирусов гриппа А [151]. Аналогичная информация относительно вирусов гриппа В в литературе отсутствует.

Заключение

Невозможно сделать какие-то затрагивающие широкий временной диапазон долгосрочные прогнозы в отношении направлений дальнейшего эволюционирования вирусов гриппа В. Неизвестно, появятся ли снова в циркуляции вирусы линии В/Yamagata, возникнет ли новая, радикальным образом отличающаяся линия или будет развиваться только линия В/Victoria. Длительная циркуляция вирусов гриппа В популяции приводит к их значительной гетерогенности по многим биологическим свойствам, в основе которой лежит приспособление к возрастающему иммунологическому прессу. Непрерывное появление мутаций в гемагглютинине со временем приводит к изменению антигенных свойств и является причиной антигенного дрейфа; анализ сопровождающей антигенный дрейф эволюционной изменчивости предоставляет значимую информацию об антигенности, патогенности, рецептор-связывающей специфичности, гликозилировании и других свойствах вирусов. Биологические свойства возбудителя так или иначе определяют его способность к самосохранению. Каким бы антигенно новым не был очередной вариант вируса гриппа, вне зависимости от своей антигенной новизны и уникальности он будет обладать определенным набором биологических свойств, комбинация которых позволит возбудителю наилучшим образом выживать в организме чувствительного хозяина.

Список литературы/References

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб.: Наука, 1994. 152 с. [Alexandrova G.I., Klimov A.I. Live influenza vaccine. *St. Petersburg: Nauka, 1994. 152 p. (In Russ.)*]
2. Иванова В.Т., Матюшина Р.О., Слепушкин Е.И., Бурцева Е.И., Оскерко Т.А., Шевченко Е.С., Трушакова С.В., Курочкина И.Е., Загорская Ю.Н., Черкасов Е.Г., Меркулова Л.Н., Федоритова Е.Л. Эпидемические штаммы вирусов гриппа А и В в сезоне 2005–2006 гг. в России // Вопросы вирусологии. 2008. Т. 53, № 5. С. 13–18. [Ivanova V.T., Matiushina R.O., Slepushkin A.N., Burtseva E.I., Oskerko T.A., Shevchenko E.S., Trushakova S.V., Kurochka I.E., Zagorskaia Yu.N., Cherkasov E.G., Merkulova L.N., Feodoritova E.L. Epidemic strains influenza viruses A and B in the 2005–2006 season In Russia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2008, vol. 53, no. 5, pp. 13–18. (In Russ.)*]
3. Иванова В.Т., Ракутина Р.О., Слепушкин А.Н., Бурцева Е.И., Оскерко Т.А., Шевченко Е.С., Федорова Н.В., Кордюкова Л.В., Трушакова С.В., Черкасов Е.Г., Меркулова Л.Н., Федоритова Е.Л. Свойства эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В, циркулировавших в эпидемическом сезоне 2004–2005 гг. в России // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51, № 6. С. 27–30. [Ivanova V.T., Rakutina R.O., Slepushkin A.N., Burtseva E.I., Oskerko T.A., Shevchenko E.S., Fedorova N.V., Kordiukova L.V., Trushakova S.V., Cherkasov E.G., Merkulova L.N., Feodoritova E.L. The properties of the epidemic influenza viruses A and B strains circulating in Russia in the 2004–2005 epidemic season. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2006, vol. 51, no. 6, pp. 27–30. (In Russ.)*]
4. Иванова В.Т., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Шевченко Е.С., Колобухина Л.В., Вартанян Р.В., Белякова Н.В., Яцышина С.Б., Федоритова Е.Л., Зуева Н.Д., Бурцева Е.И. Характеристика циркулировавших в России в сезон 2007–2008 гг. эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В // Вопросы вирусологии. 2009. Т. 54, № 5. С. 28–33. [Ivanova V.T., Trushakova S.V., Oskerko T.A., Shevchenko E.S., Kolobukhina L.V., Vartanyan R.V., Belyakova N.V., Yatsyshina S.B., Feodoritova E.L., Zueva N.D., Burtseva E.I. The characteristics of epidemic influenza A and B strains circulating in Russia during the 2007–2008 season. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology, 2009, vol. 54, no. 5, pp. 28–33. (In Russ.)*]
5. Карпова Л.С., Маринич И.Г., Смородинцева Е.А., Столяров К.А. Особенности эпидемий в сезон 2005–2006 годов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2007. Т. 33, № 2. С. 6–9. [Karpova L.S., Marinich I.G., Smorodintseva E.A., Stolyarov K.A. Peculiarities of epidemics in the 2005–2006 season. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention, 2007, vol. 33, no. 2, pp. 6–9. (In Russ.)*]
6. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Drieszen van der Cruijzen S.K.M., Heldens J.G.M., van den Bosch J.F., Руденко Л.Г. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины А и В // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010. № 6. С. 41–47. [Kiseleva I.V., Larionova N.V., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Drieszen van der Cruijzen S.K.M., Heldens J.G.M., van den Bosch J.F., Rudenko L.G. Leading role of genes coding polymerase complex in attenuation of domestic donor viruses for A and B live influenza vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2010, no. 6, pp. 41–47. (In Russ.)*]
7. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Литвинова О.М., Иванова В.В., Исакова И.Н., Медведева Т.Е., Александрова Г.И., Руденко Л.Г. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа // Медицинский академический журнал. 2002. Т. 2, № 3. С. 49–57. [Kiseleva I.V., Larionova N.V., Litvinova O.M., Ivanova V.V., Isakova I.N., Medvedeva T.E., Alexandrova G.I., Rudenko L.G. Changes in the temperature sensitivity as a reflection of the evolutionary variability of epidemic strains of influenza viruses. *Meditinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal, 2002, vol. 2, no. 3, pp. 49–57. (In Russ.)*]
8. Коновалова Н.И., Еропкин М.Ю., Гудкова Т.М., Григорьева В.А., Даниленко Д.М., Иванова А.В., Смирнова Т.С., Лобова Т.Г., Шеканова С.М. Этиологическая характеристика эпидемий гриппа 2006–2009 гг. в Российской Федерации (по данным НИИ гриппа СЗО РАМН) // Вопросы вирусологии. 2010. Т. 55, № 5. С. 9–16. [Konovalova N.I., Eroptkin M.Yu., Gudkova T.M., Grigorieva V.A., Danilenko D.M., Ivanova A.V., Smirnova T.S., Lobova T.G., Shekanova S.M. Etiological characteristics of the influenza epidemics of 2006–2009 in the Russian Federation (according to the data of the Research Institute of Influenza, North–Western Branch, Russian Academy of Medical Sciences). *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2010, vol. 55, no. 5, pp. 9–16. (In Russ.)*]
9. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова И.Н., Литвинова О.М., Руденко Л.Г. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа В, выделенных в разные годы // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51, № 5. С. 38–41. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Isakova I.N., Litvinova O.M., Rudenko L.G. Phenotype of epidemic influenza B virus strains isolated in different years. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2006, vol. 51, no. 5, pp. 38–41. (In Russ.)*]
10. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Эволюция вирусов гриппа по признаку чувствительности к температуре репродукции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019. Т. 96, № 6. С. 47–55. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Evolution of influenza viruses based on sensitivity to temperature of replication. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2019, vol. 96, no. 6, pp. 47–55. (In Russ.)* doi: 10.36233/0372-9311-2019-6-47-55
11. Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Паянкова А.А., Суховецкая В.Ф., Гудкова Т.М., Григорьева В.А., Грудинин М.П., Еропкин М.Ю. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. // Вопросы вирусологии. 2012. Т. 57, № 6. С. 22–26. [Lobova T.G., Prokopets A.V., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Paiankova A.A., Sukhovetskaia V.F., Gudkova T.M., Grigor'eva V.A., Grudinin M.P., Eroptkin M.Iu. Evolutionary variability of influenza B viruses In Russian Federation in 2005–2012. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2012, vol. 57, no. 6, pp. 22–26. (In Russ.)*]
12. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Бовин Н.В., Игнатьева А.В., Краснослободцев К.Г., Федоритова Е.Л., Трушакова С.В., Бреслав Н.В., Меркулова Л.Н., Мукашева Е.А., Хлопова И.Н., Воронина О.Л., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Вартанян Н.В., Кистенева Л.Б., Кириллов И.М., Прошина Е.С.,

- Росаткевич А.Г., Кружкова И.С., Заплатников А.Л., Базарова М.В., Сметанина С.В., Харламов М.В., Карпов Н.Л., Шихин А.В. Особенности циркуляции вирусов гриппа и ОРВИ в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. в отдельных регионах России // *Вопросы вирусологии*. 2020. Т. 65, № 6. С. 335–349. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Bovin N.V., Ignatieva A.V., Krasnoslobodtsev K.G., Feodoritova E.L., Trushakova S.L.V., Breslav N.V., Merkulova L.N., Mukasheva E.A., Khlopova I.N., Voronina O.L., Aksenova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Vartanyan N.V., Kisteneva L.B., Kirillov I.M., Proshina E.S., Rosatkevich A.G., Kruzhkova I.S., Zaplatnikov A.L., Bazarova M.V., Smetanina S.V., Kharlamov M.V., Karpov N.L., Shikhin A.V. Peculiarities of the influenza and ARVI viruses circulation during epidemic season 2019–2020 in some regions of Russia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, vol. 65, no. 6, pp. 335–349. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-6-4
13. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лавришева В.В. Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Иванова РАМН об итогах эпидемического сезона 2009–2010 гг. по гриппу и ОРВИ (с 40-й недели 2009 г. по 22-ю неделю 2010 г.) в мире и в России // *Вопросы вирусологии*, 2011. Т. 56, № 1. С. 44–49. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Lavrishcheva V.V. Information of the Center for Ecology and Epidemiology of Influenza, D.I. Ivanovskiy Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, on the results of the 2009–2010 influenza and acute respiratory viral infection epidemic season (at week 40 of 2009 to week 22 of 2010) in the world and Russia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 44–49. (In Russ.)]
 14. Медведева Т.Е., Гольдфарб В.Э., Немзер С.Л., Полежаев Ф.И., Румовский В.И., Александрова Г.И. Сравнительная характеристика rct40 и S генетических признаков вакцинных штаммов вируса гриппа и их корреляция с уровнем вирулентности для взрослых и детей // *Иммунология и специфическая профилактика гриппа у детей: сб. науч. тр.*, 1971. Л.: Наука. С. 195–208. [Medvedeva T.E., Goldfarb V.E., Nemzer S.L., Polezhaev F.I., Rumovsky V.I., Aleksandrova G.I. Comparative characteristics of rct40 and S genetic characteristics of influenza virus vaccine strains and their correlation with the level of virulence for adults and children. In: *Immunology and specific prevention of influenza in children*. Leningrad: Nauka, 1971, pp. 195–208. (In Russ.)]
 15. Медведева Т.Е., Егоров А.Ю., Климов А.И., Унанов С.С., Юминова Н.В., Выродов Б.В., Слепушкин А.Н., Обросова-Серова Н.П., Бурцева Е.И., Александрова Г.И. Атенуированный рекомбинант вируса гриппа типа В/Энн Арбор/2/86 с холодоадаптированным штаммом В/Ленинград/14/17/55 // *Вопросы вирусологии*. 1989. Т. 34, № 5. С. 584–598. [Medvedeva T.E., Egorov A.Yu., Klimov A.I., Unanov S.S., Yuminova N.V., Vyrodov B.V., Slepushkin A.N., Obrosova-Serova N.P., Burtseva E.I., Alexandrova G.I. Attenuated recombinant influenza type B virus obtained during crossing of virus B/Ann Arbor/2/86 with the cold-adapted strain B/Leningrad/14/17/55. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1989, vol. 65, no. 6, pp. 335–349. (In Russ.)]
 16. Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Выделение температурочувствительных штаммов вируса гриппа в эпидемию, вызванную вирусом А/Виктория в 1975–1976 гг. // *Вопросы вирусологии*. 1979. Т. 24, № 5. С. 430. [Polezhaev F.I., Aleksandrova G.I. Isolation of temperature-sensitive strains of the influenza virus in the epidemic caused by the A/Victoria virus in 1975–1976. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1979, vol. 24, no. 4, p. 430. (In Russ.)]
 17. Полежаев Ф.И., Смородинцев А.А. Роль температурочувствительных мутантов в естественной эволюции вируса гриппа // *Вопросы вирусологии*. 1986. Т. 31, № 2. С. 148–152. [Polezhaev F.I., Smorodintsev A.A. Role of temperature-sensitive mutants in the natural evolution of the influenza virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1986, vol. 31, no. 2, pp. 48–152. (In Russ.)]
 18. Яхно М.А., Закстельская Л.И., Молибог Э.В., Иванова В.Т., Шендерович С.Ф. Сравнительные характеристики эпидемических штаммов вируса гриппа В, выделенных в 1980–1981 годах // *Вопросы вирусологии*. 1982. Т. 27, № 6. С. 656–661. [Iakhno M.A., Zakstel'skaya L.I., Molibog E.V., Ivanova V.T., Shenderovich S.F. Comparative characteristics of epidemic strains of the influenza virus B isolated in 1980–1981. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1982, vol. 27, no. 6, pp. 656–661. (In Russ.)]
 19. Al Farroukh M., Kiseleva I., Bazhenova E., Stepanova E., Puchkova L., Rudenko L. Understanding the variability of certain biological properties of H1N1pdm09 influenza viruses. *Vaccines (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 3: 395. doi: 10.3390/vaccines10030395
 20. Alexandrova G.I., Maassab H.F., Kendal A.P., Medvedeva T.E., Egorov A.Y., Klimov A.I., Cox N.J. Laboratory properties of cold-adapted influenza B live vaccine strains developed in the US and USSR, and their B/Ann Arbor/1/86 cold-adapted reassortant vaccine candidates. *Vaccine*, 1990, vol. 8, no. 1, pp. 61–64. doi: 10.1016/0264-410x(90)90179-p
 21. Ananthanarayan R., Paniker C.K. Non-specific inhibitors of influenza viruses in normal sera. *Bull. World. Health. Organ*, 1960, vol. 22, no. 3–4, pp. 409–419.
 22. Bedford T., Riley S., Barr I.G., Broor S., Chadha M., Cox N.J., Daniels R.S., Gunasekaran C.P., Hurt A.C., Kelso A., Klimov A., Lewis N.S., Li X., McCauley J.W., Odagiri T., Potdar V., Rambaut A., Shu Y., Skepner E., Smith D.J., Suchard M.A., Tashiro M., Wang D., Xu X., Lemey P., Russell C.A. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*, 2015, vol. 523, no. 7559, pp. 217–220. doi: 10.1038/nature14460
 23. Belshe R.B. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine*, 2010, vol. 28, suppl. 4, pp. D45–53. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.028
 24. Blyth C.C., Foo H., van Hal S.J., Hurt A.C., Barr I.G., McPhie K., Armstrong P.K., Rawlinson W.D., Sheppard V., Conaty S., Staff M., Dwyer D.E. Influenza outbreaks during World Youth Day 2008 mass gathering. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, no. 5, pp. 809–815. doi: 10.3201/eid1605.091136
 25. Bouvier N.M., Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 2008, vol. 26, suppl. 4, pp. D49–53. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.039
 26. Brüssow H. The not so universal tree of life or the place of viruses in the living world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2009, vol. 364, no. 1527, pp. 2263–2274. doi: 10.1098/rstb.2009.0036
 27. Caffrey M., Lavie A. pH-dependent mechanisms of influenza infection mediated by hemagglutinin. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, vol. 8: 777095. doi: 10.3389/fmolb.2021.777095

28. Caini S., Kuszniierz G., Garate V.V., Wangchuk S., Thapa B., de Paula Júnior F.J., Ferreira de Almeida W.A., Njouom R., Fasce R.A., Bustos P., Feng L., Peng Z., Araya J.L., Bruno A., de Mora D., Barahona de Gámez M.J., Pebody R., Zambon M., Higueros R., Rivera R., Kosasih H., Castrucci M.R., Bella A., Kadjo H.A., Daouda C., Makusheva A., Bessonova O., Chaves S.S., Emukule G.O., Heraud J.M., Razanajatovo N.H., Baraka A., El Falaki F., Meije A., Donker G.A., Huang Q.S., Wood T., Balmaseda A., Palekar R., Arévalo B.M., Rodrigues A.P., Guiomar R., Lee V.J.M., Ang L.W., Cohen C., Treurnicht F., Mironenko A., Holubka O., Bresee J., Brammer L., Le M.T.Q., Hoang P.V.M., El Guerche-Séblain C., Paget J. The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 9: e0222381. doi: 10.1371/journal.pone.0222381
29. Camilloni B., Neri M., Lepri E., Basileo M., Sigismondi N., Puzelli S., Donatelli I., Iorio A.M. An influenza B outbreak during the 2007/2008 winter among appropriately immunized elderly people living in a nursing home. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 47, pp. 7536–7541. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.064
30. Carr C.M., Chaudhry C., Kim P.S. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, no. 26, pp. 14306–14313. doi: 10.1073/pnas.94.26.14306
31. Cate T.R. Clinical manifestations and consequences of influenza. *Am. J. Med.*, 1987, vol. 82, no. 6A, pp. 15–19. doi: 10.1016/0002-9343(87)90555-9
32. Chen R., Holmes E.C. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J. Mol. Evol.*, 2008, vol. 66, no. 6, pp. 655–663. doi: 10.1007/s00239-008-9119-z
33. Chi C.Y., Wang S.M., Lin C.C., Wang H.C., Wang J.R., Su I.J., Liu C.C. Clinical features of children infected with different strains of influenza B in southern Taiwan. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2008, vol. 27, no. 7, pp. 640–645. doi: 10.1097/INF.0b013e31816be008
34. Chu C.M., Tian S.F., Ren G.F., Zhang Y.M., Zhang L.X., Liu G.Q. Occurrence of temperature-sensitive influenza A viruses in nature. *J. Virol.*, 1982, vol. 41, no. 2, pp. 353–359. doi: 10.1128/JVI.41.2.353-359.1982
35. Claverie J.M., Ogata H. Ten good reasons not to exclude viruses from the evolutionary picture. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, vol. 7, no. 8: 615. doi: 10.1038/nrmicro2108-c3
36. Cohen A. Protection of mice against Asian influenza-virus infection by a normal horse-serum inhibitor. *Lancet*, 1960, vol. 2, no. 7154, pp. 791–794. doi: 10.1016/s0140-6736(60)91859-6
37. Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 1994, vol. 205, no. 1, pp. 17–23. doi: 10.1006/viro.1994.1615
38. Couceiro J.N., Paulson J.C., Baum L.G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus. Res.*, 1993, vol. 29, no. 2, pp. 155–165. doi: 10.1016/0168-1702(93)90056-s
39. Da Silva D.B.B., de Oliveira Santos K.C., Benega M.A., de Paiva T.M. Differentiation of influenza B lineages circulating in different regions of Brazil, 2014–2016, using molecular assay. *Vaccine. X*, 2022, vol. 12: 100220. doi: 10.1016/j.jvacx.2022.100220
40. De Jong J.C., Beyer W.E.P., Palache A.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J. Med. Virol.*, 2000, vol. 61, no. 1, pp. 94–99.
41. De Lejarazu R.O., Domingo J.D., de Miguel A.G., Torres F.M., Quilo C.G., Guillén J.M., Piedrafita B., Marguello E.R. [Description of Influenza B in seasonal epidemics in Spain]. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2018, vol. 31, no. 6, pp. 511–519.
42. De Prada L.S., Rojo-Rello S., Domínguez G.M., Gómez E.T., de Lejarazu R.O., Eiros J.M., Sanz-Muñoz I. Influenza B lineages have more in common than meets the eye. Trivalent influenza B vaccines trigger heterotypic antibodies against both influenza B viruses. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12: 737216. doi: 10.3389/fmicb.2021.737216
43. Dehbandi R., Zazouli M.A. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet. Microbe.*, 2020, vol. 1, no. 4: e145. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30093-8
44. DuBois R.M., Zaraket H., Reddivari M., Heath R.J., White S.W., Russell C.J. Acid stability of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 12: e1002398. doi: 10.1371/journal.ppat.1002398
45. ECDC. 2018. Infographic: Influenza in Europe, season 2017–2018. Accessed 20 March 2024.
46. ECDC. 2018. Seasonal influenza — annual epidemiological report for 2017–2018. Accessed 20 March 2024.
47. Eslami H., Jalili M. The role of environmental factors to transmission of SARS-CoV-2 (COVID-19). *AMB Express*, 2020, vol. 10, no. 1: 92. doi: 10.1186/s13568-020-01028-0
48. Firquet S., Beaujard S., Lobert P.E., Sané F., Caloone D., Izard D., Hober D. Survival of enveloped and non-enveloped viruses on inanimate surfaces. *Microbes. Environ.*, 2015, vol. 30, no. 2, pp. 140–144. doi: 10.1264/jsme2.ME14145
49. Francis T. Jr. A new type of virus from epidemic influenza. *Science*, 1940, vol. 92, no. 2392, pp. 405–408. doi: 10.1126/science.92.2392.405
50. Gambaryan A.S., Robertson J.S., Matrosovich M.N. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology*, 1999, vol. 258, no. 2, pp. 232–239. doi: 10.1006/viro.1999.9732
51. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Robertson J.S., Bovin N.V., Matrosovich M.N. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyl)lactosamine. *Virology*, 1997, vol. 232, no. 2, pp. 345–350. doi: 10.1006/viro.1997.8572
52. Geller C., Varbanov M., Duval R.E. Human coronaviruses: Insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. *Viruses*, 2012, vol. 4, no. 11, pp. 3044–3068. doi: 10.3390/v4113044
53. Geraci J.R., St Aubin D.J., Barker I.K., Webster R.G., Hinshaw V.S., Bean W.J., Ruhnke H.L., Prescott J.H., Early G., Baker A.S., Madoff S., Schooley R.T. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 1982, vol. 215, no. 4536, pp. 1129–1131. doi: 10.1126/science.7063847
54. Giesendorf B., Bosch F.X., Orlich M., Scholtissek C., Rott R. Studies on the temperature sensitivity of influenza A virus reassortants nonpathogenic for chicken. *Virus. Res.*, 1986, vol. 5, no. 1, pp. 27–42. doi: 10.1016/0168-1702(86)90063-8

55. Giesendorf B., Bosch F.X., Wahn K., Rot R. Temperature sensitivity in maturation of mammalian influenza A viruses. *Virus Res.*, 1984, vol. 1, no. 8, pp. 655–667. doi: 10.1016/0168-1702(84)90056-X
56. Gimsa U., Grötzinger I., Gimsa J. Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity. *Virus Res.*, 1996, vol. 42, no. 1–2, pp. 127–135. doi: 10.1016/0168-1702(96)01304-4
57. GISAID. The Global Initiative on Sharing All Influenza Data. 2024. Accessed 20 March 2024.
58. Glezen W.P., Schmier J.K., Kuehn C.M., Ryan K.J., Oxford J. The burden of influenza B: a structured literature review. *Am. J. Public Health.*, 2013, vol. 103, no. 3: e43–51. doi: 10.2105/AJPH.2012.301137
59. Hegde N.R., Maddur M.S., Kaveri S.V., Bayry J. Reasons to include viruses in the tree of life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, vol. 7, no. 8: 615. doi: 10.1038/nrmicro2108-c1
60. Heikkinen T., Ikonen N., Ziegler T. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating viruses, 1999–2012. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, vol. 59, no. 11, pp. 1519–1524. doi: 10.1093/cid/ciu664
61. Hemalatha M., Kiran U., Kuncha S.K., Kopperi H., Gokulan C.G., Mohan S.V., Mishra R.K. Surveillance of SARS-CoV-2 spread using wastewater-based epidemiology: comprehensive study. *Sci. Total. Environ.*, 2021, vol. 768: 144704. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144704
62. Hendley J.O., Wenzel R.P., Gwaltney J.M., Jr. Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. *N. Engl. J. Med.*, 1973, vol. 88, no. 26, pp. 1361–1364. doi: 10.1056/NEJM197306282882601
63. Henwood A.F. Coronavirus disinfection in histopathology. *J. Histotechnol.*, 2020, vol. 43, no. 2, pp. 102–104. doi: 10.1080/0147885.2020.1734718
64. Hirose R., Ikegaya H., Naito Y., Watanabe N., Yoshida T., Bandou R., Daidoji T., Itoh Y., Nakaya T. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and influenza virus on human skin: Importance of hand hygiene in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.*, 2021, vol. 73, no. 11, pp. e4329–e4335. doi: 10.1093/cid/ciaa1517
65. Jackson D., Elderfield R.A., Barclay W.S. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J. Gen. Virol.*, 2011, vol. 92, pt 1, pp. 1–17. doi: 10.1099/vir.0.026187-0
66. Jacobs S.E., Lamson D.M., St. George K., Walsh T.J. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 1, pp. 135–162. doi: 10.1128/CMR.00077-12
67. Kanegae Y., Sugita S., Endo A., Ishida M., Senya S., Osako K., Nerome K., Oya A. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, no. 6, pp. 2860–2865. doi: 10.1128/jvi.64.6.2860-2865.1990
68. Kilbourne E.D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, vol. 12, no. 1, pp. 9–14. doi: 10.3201/eid1201.051254
69. Kiseleva I.V., Voeten J.T., Teley L.C., Larionova N.V., Drieszen-van der Crujjsen S.K., Basten S.M., Heldens J.G., van den Bosch H., Rudenko L.G. PB2 and PA genes control the expression of the temperature-sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus. *J. Gen. Virol.*, 2010, vol. 91, pt 4, pp. 931–937. doi: 10.1099/vir.0.017996-0
70. Kiseleva I., Larionova N. Chapter 3. Influenza virus ecology and evolution. In: I. Kiseleva (Ed.), *Influenza: a century of research. Sharjah, UAE: Bentham Science Publisher Ltd*, 2021, pp. 63–97. doi: 10.2174/978168108844012101000
71. Kormuth K.A., Lin K., Qian Z., Myerburg M.M., Marr L.C., Lakdawala S.S. Environmental persistence of influenza viruses is dependent upon virus type and host origin. *mSphere*, 2019, vol. 4, no. 4: e00552-19. doi: 10.1128/mSphere.00552-19
72. Korte T., Ludwig K., Huang Q., Rachakonda P.S., Herrmann A. Conformational change of influenza virus hemagglutinin is sensitive to ionic concentration. *Eur. Biophys. J.*, 2007, vol. 36, no. 4–5, pp. 327–335. doi: 10.1007/s00249-006-0116-0
73. Koutsakos M., Wheatley A.K., Laurie K., Kent S.J., Rockman S. Influenza lineage extinction during the COVID-19 pandemic? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, vol. 19, no. 12, pp. 741–742. doi: 10.1038/s41579-021-00642-4
74. Kramer A., Schwebke I., Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.*, 2006, vol. 6: 130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130
75. Krizanová O., Rathová V. Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr. Top. Microbiol.*, 1969, vol. 47, pp. 125–151. doi: 10.1007/978-3-642-46160-6_6
76. Lamarre A., Talbot P.J. Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. *Can. J. Microbiol.*, 1989, vol. 35, no. 10, pp. 972–974. doi: 10.1139/m89-160
77. Langat P., Raghwanji J., Dudas G., Bowden T.A., Edwards S., Gall A., Bedford T., Rambaut A., Daniels R.S., Russell C.A., Pybus O.G., McCauley J., Kellam P., Watson S.J. Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 12: e1006749. doi: 10.1371/journal.ppat.1006749
78. Laporte M., Stevaert A., Raeymaekers V., Boogaerts T., Neelmeier I., Chiu W., Benkheil M., Vanaudenaerde B., Pöhlmann S., Naesens L. Hemagglutinin cleavability, acid stability, and temperature dependence optimize influenza B virus for replication in human airways. *J. Virol.*, 2019, vol. 94, no. 1: e01430-19. doi: 10.1128/jvi.01430-19
79. Larionova N., Kiseleva I., Isakova I., Litvinova O., Klimov A., Rudenko L. Naturally occurring temperature-sensitive strains of influenza B virus. *International Journal of Recent Scientific Research (IVW-2004 Conference proceedings)*. 2004, pp. 92–97.
80. Leyva-Grado V.H., Mubareka S., Krammer F., Cárdenas W.B., Palese P. Influenza virus infection in guinea pigs raised as live-stock, Ecuador. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 7, pp. 1135–1138. doi: 10.3201/eid1807.111930
81. Lin J.H., Chiu S.C., Shaw M.W., Lin Y.C., Lee C.H., Chen H.Y., Klimov A. Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004–2005 season in Taiwan. *Virus Res.*, 2007, vol. 124, no. 1–2, pp. 204–211. doi: 10.1016/j.virusres.2006.11.005
82. Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res.*, 2004, vol. 103, no. 1–2, pp. 47–52. doi: 10.1016/j.virusres.2004.02.011
83. Linster M., van Boheemen S., de Graaf M., Schrauwen E.J.A., Lexmond P., Mänz B., Bestebroer T.M., Baumann J., van Riel D., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A., Matrosovich M., Fouchier R.A.M., Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*, 2014, vol. 157, no. 2, pp. 329–339. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.040

84. Lobdozinska M., Klubinska B. Segregation of influenza A, A2 and B virus strains into strains with varying sensitivity to horse serum inhibitor. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 1960, vol. 8, pp. 687–694.
85. Long J.S., Mistry B., Haslam S.M., Barclay W.S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, vol. 17, no. 2, pp. 67–81. doi: 10.1038/s41579-018-0115-z
86. Maassab H.F., Heilman C.A., Herlocher M.L. Cold-adapted influenza viruses for use as live vaccines for man. *Adv. Biotechnol. Processes.*, 1990, vol. 14, pp. 203–242.
87. Mahl M.C., Sadler C. Virus survival on inanimate surfaces. *Can. J. Microbiol.*, 1975, vol. 21, no. 6, pp. 819–823. doi: 10.1139/m75-121
88. Massin P., van der Werf S., Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, no. 11, pp. 5398–5404. doi: 10.1128/jvi.75.11.5398-5404.2001
89. Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 13, pp. 4620–4624. doi: 10.1073/pnas.0308001101
90. Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 22, pp. 12665–12667. doi: 10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004
91. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6373–6380. doi: 10.1128/jvi.72.8.6373-6380.1998
92. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., Donatelli I., Kawaoka Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, no. 18, pp. 8502–8512. doi: 10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000
93. McCauley J.W., Penn C.R. The critical cut-off temperature of avian influenza viruses. *Virus. Res.*, 1990, vol. 17, no. 3, pp. 191–198. doi: 10.1016/0168-1702(90)90064-i
94. McCullers J.A., Saito T., Iverson A.R. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 23, pp. 12817–12828. doi: 10.1128/jvi.78.23.12817-12828.2004
95. Mellman I., Fuchs R., Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, vol. 55, pp. 663–700. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.003311
96. Mohan S.V., Hemalatha M., Kopperi H., Ranjith I., Kumar A.K. SARS-CoV-2 in environmental perspective: Occurrence, persistence, surveillance, inactivation and challenges. *Chem. Eng. J.*, 2021, vol. 405: 126893. doi: 10.1016/j.cej.2020.126893
97. Monto A.S., Miller F.D., Maassab H.F. Evaluation of an attenuated, cold-recombinant influenza B virus vaccine. *J. Infect. Dis.*, 1982, vol. 145, no. 1, pp. 57–64. doi: 10.1093/infdis/145.1.57
98. Moreira D., López-García P. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, vol. 7, no. 4, pp. 306–311. doi: 10.1038/nrmicro2108
99. Mosnier A., Caini S., Daviaud I., Bensoussan J.L., Stoll-Keller F., Bui T.T., Lina B., van der Werf S., Cohen J.M. Ten influenza seasons in France: distribution and timing of influenza A and B circulation, 2003–2013. *BMC Infect. Dis.*, 2015, vol. 15: 357. doi: 10.1186/s12879-015-1056-z
100. Mould J.A., Paterson R.G., Takeda M., Ohigashi Y., Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H. Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Dev. Cell.*, 2003, vol. 5, no. 1, pp. 175–184. doi: 10.1016/s1534-5807(03)00190-4
101. Nakagawa N., Higashi N., Nakagawa T. Cocirculation of antigenic variants and the vaccine-type virus during the 2004–2005 influenza B virus epidemics in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 2, pp. 352–357. doi: 10.1128/jcm.01357-08
102. Nakowitsch S., Waltenberger A.M., Wressnigg N., Ferstl N., Triendl A., Kiefmann B., Montomoli E., Lapini G., Sergeeva M., Muster T., Romanova J.R. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnol. J.*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 405–414. doi: 10.1002/biot.201300225
103. Nakowitsch S., Wolschek M., Morokutti A., Ruthsatz T., Krenn B.M., Ferko B., Ferstl N., Triendl A., Muster T., Egorov A., Romanova J. Mutations affecting the stability of the haemagglutinin molecule impair the immunogenicity of live attenuated H3N2 intranasal influenza vaccine candidates lacking NSI. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 19, pp. 3517–3524. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.100
104. NCBI. Influenza Virus Database. 2024. Accessed 20 March 2024.
105. Nobusawa E., Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 7, pp. 3675–3678. doi: 10.1128/jvi.80.7.3675-3678.2006
106. Ohishi K., Ninomiya A., Kida H., Park C.H., Maruyama T., Arai T., Katsumata E., Tobayama T., Boltunov A.N., Khuraskin L.S., Miyazaki N. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol. Immunol.*, 2002, vol. 46, no. 9, pp. 639–644. doi: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02746.x
107. Oliveira A.C., Ishimaru D., Gonçalves R.B., Smith T.J., Mason P., Sá-Carvalho D., Silva J.L. Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating. *Biophys. J.*, 1999, vol. 76, no. 3, pp. 1270–1279. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77290-5
108. Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, vol. 288, no. 5468, pp. 1051–1053. doi: 10.1126/science.288.5468.1051
109. Otter J.A., Donskey C., Yezli S., Douthwaite S., Goldenberg S.D., Weber D.J. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J. Hosp. Infect.*, 2016, vol. 92, no. 3, pp. 235–250. doi: 10.1016/j.jhin.2015.08.027
110. Oxford J.S., Corcoran T., Schild G.C. Naturally occurring temperature-sensitive influenza A viruses of the H1N1 and H3N2 subtypes. *J. Gen. Virol.*, 1980, vol. 48, pt 2, pp. 383–389. doi: 10.1099/0022-1317-48-2-383
111. Paget J., Caini S., Del Riccio M., van Waarden W., Meijer A. Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? *Euro Surveill.*, 2022, vol. 27, no. 39: 2200753. doi: 10.2807/1560-7917.es.2022.27.39.2200753

112. Papadopoulos N.G., Sanderson G., Hunter J., Johnston S.L. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *J. Med. Virol.*, 1999, vol. 58, no. 1, pp. 100–104. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199905)58:1<100::aid-jmv16>3.0.co;2-d
113. Pérez L., Carrasco L. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, no. 8, pp. 4543–4548. doi: 10.1128/JVI.67.8.4543-4548.1993
114. Pritchett T.J., Paulson J.C. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, no. 17, pp. 9850–9858.
115. Puzelli S., Di Martino A., Facchini M., Fabiani C., Calzoletti L., Di Mario G., Palmieri A., Affanni P., Camilloni B., Chironna M., D'Agaro P., Giannecchini S., Pariani E., Serra C., Rizzo C., Bella A., Donatelli I., Castrucci M.R. Co-circulation of the two influenza B lineages during 13 consecutive influenza surveillance seasons in Italy, 2004–2017. *BMC Infect. Dis.*, 2019, vol. 19, no. 1: 990. doi: 10.1186/s12879-019-4621-z
116. Rapoport E., Mochalova L., Gabius H.J., Romanova J., Bovin N. The search for additional virus to cell interactions. *Glycoconj. J.*, 2006, vol. 23, pp. 115–125. doi: 10.1007/s10719-006-5444-x
117. Rogers G.N., D'Souza B.L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology*, 1989, vol. 173, no. 1, pp. 317–322. doi: 10.1016/0042-6822(89)90249-3
118. Rogers G.N., Pritchett T.J., Lane J.L., Paulson J.C. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: Selection of receptor specific variants. *Virology*, 1983, vol. 131, no. 2, pp. 394–408. doi: 10.1016/0042-6822(83)90507-x
119. Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., Rota J.S., Kendal A.P., Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*, 1990, vol. 175, no. 1, pp. 59–68. doi: 10.1016/0042-6822(90)90186-u
120. Roy T., Agrawal A.S., Mukherjee A., Mishra A.C., Chadha M.S., Kaur H., Chawla-Sarkar M. Surveillance and molecular characterization of human influenza B viruses during 2006–2010 revealed co-circulation of Yamagata-like and Victoria-like strains in eastern India. *Infect. Genet. Evol.*, 2011, vol. 11, no. 7, pp. 1595–1601. doi: 10.1016/j.meegid.2011.05.022
121. Ruigrok R.W., Martin S.R., Wharton S.A., Skehel J.J., Bayley P.M., Wiley D.C. Conformational changes in the hemagglutinin of influenza virus, which accompany heat-induced fusion of virus with liposomes. *Virology*, 1986, vol. 155, no. 2, pp. 484–497. doi: 10.1016/0042-6822(86)90210-2
122. Russell C.J. Hemagglutinin stability and its impact on influenza a virus infectivity, pathogenicity, and transmissibility in avians, mice, swine, seals, ferrets, and humans. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 5: 746. doi: 10.3390/v13050746
123. Russell C.J., Hu M., Okda F.A. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk. *Trends Microbiol.*, 2018, vol. 26, no. 10, pp. 841–853. doi: 10.1016/j.tim.2018.03.005
124. Ryan-Poirier K.A., Kawaoka Y. Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, no. 1, pp. 389–395. doi: 10.1128/jvi.65.1.389-395.1991
125. Sagripanti J.L., Lytle C.D. Inactivation of influenza virus by solar radiation. *Photochem. Photobiol.*, 2007, vol. 83, no. 5, pp. 1278–1282. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00177.x
126. Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine*, 1985, vol. 3, suppl. 3, pp. 215–218. doi: 10.1016/0264-410x(85)90109-4
127. Sergeeva M., Krokhin A., Matrosovich M., Matrosovich T., Wolschek M., Kiselev O., Romanova J. H5N1 influenza vaccine quality is affected by hemagglutinin conformational stability. *MIR Journal*, 2014, vol. 1, pp. 12–21. doi: 10.18527/2500-2236-2014-1-1-12-26
128. Shaw M.W., Xu X., Li Y., Normand S., Ueki R.T., Kunitomo G.Y., Hall H., Klimov A., Cox N.J., Subbarao K. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000–2001 and 2001–2002 seasons. *Virology*, 2002, vol. 303, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1006/viro.2002.1719
129. Shi Y., Wu Y., Zhang W., Qi J., Gao G.F. Enabling the ‘host jump’: structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, vol. 12, no. 12, pp. 822–831. doi: 10.1038/nrmicro3362
130. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, vol. 440, no. 7083, pp. 435–436. doi: 10.1038/440435a
131. Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*, 1933, vol. 222, no. 5732, pp. 66–68. doi: 10.1016/S0140-6736(00)78541-2
132. Suzuki Y., Nei M. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol. Biol. Evol.*, 2002, vol. 19, no. 4, pp. 501–509. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004105
133. Tafalla M., Buijssen M., Geets R., Vonk Noordegraaf-Schouten M. A comprehensive review of the epidemiology and disease burden of Influenza B in 9 European countries. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2016, vol. 12, no. 4, pp. 993–1002. doi: 10.1080/21645515.2015.1111494
134. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell. Host. Microbe*, 2010, vol. 7, no. 6, pp. 440–451. doi: 10.1016/j.chom.2010.05.009
135. Taylor R.M. Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants of the virus. *Am. J. Public Health Nations Health*, 1949, vol. 39, no. 2, pp. 171–178. doi: 10.2105/AJPH.39.2.171
136. Tewawong N., Suntronwong N., Korkong S., Theamboonlers A., Vongpunsawad S., Poovorawan Y. Evidence for influenza B virus lineage shifts and reassortants circulating in Thailand in 2014–2016. *Infect. Genet. Evol.*, 2017, vol. 47, pp. 35–40. doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.010
137. Van de Sandt C.E., Bodewes R., Rimmelzwaan G.F., de Vries R.D. Influenza B viruses: not to be discounted. *Future Microbiol.*, 2015, vol. 10, no. 9, pp. 1447–1465. doi: 10.2217/fmb.15.65
138. Vijaykrishna D., Holmes E.C., Joseph U., Fourment M., Su Y.C., Halpin R., Lee R.T., Deng Y.M., Gunalan V., Lin X., Stockwell T.B., Fedorova N.B., Zhou B., Spirason N., Kühnert D., Bošková V., Stadler T., Costa A.M., Dwyer D.E., Huang Q.S., Jennings L.C., Rawlinson W., Sullivan S.G., Hurt A.C., Maurer-Stroh S., Wentworth D.E., Smith G.J., Barr I.G. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *Elife*, 2015, vol. 4: e05055. doi: 10.7554/eLife.05055

139. Villarreal L.P., Witzany G. Viruses are essential agents within the roots and stem of the tree of life. *J. Theor. Biol.*, 2010, vol. 262, no. 4, pp. 698–710. doi: 10.1016/j.jtbi.2009.10.014
140. Virk R.K., Jayakumar J., Mendenhall I.H., Moorthy M., Lam P., Linster M., Lim J., Lin C., Oon L.L.E., Lee H.K., Koay E.S.C., Vijaykrishna D., Smith G.J.D., Su Y.C.F. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2020, vol. 117, no. 1, pp. 619–628. doi: 10.1073/pnas.1916585116
141. Wang Y.F., Chang C.F., Chi C.Y., Wang H.C., Wang J.R., Su I.J. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features. *J. Med. Virol.*, 2012, vol. 84, no. 4, pp. 679–685. doi: 10.1002/jmv.23219
142. Webby R., Richt J. Influenza in swine. In: A.S. Monto R.G. Webster T.J. Braciale R.A. Lamb (Eds.). Textbook of influenza; 2nd ed. UK: Wiley Blackwell, 2013, pp. 190–202. doi: 10.1074/jbc.R110.129809
143. Weber T.P., Stilianakis N.I. Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: a critical review. *J. Infect.*, 2008, vol. 57, no. 5, pp. 361–373. doi: 10.1016/j.jinf.2008.08.013
144. WHO. Recommendations for influenza vaccine composition. 2024.
145. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012–2013 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2012, vol. 87, no. 10, pp. 83–95.
146. WHO. Questions and answers: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the southern hemisphere 2024 influenza season and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. 2023.
147. Wilks S., de Graaf M., Smith D.J., Burke D.F. A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine*, 2012, vol. 30, no. 29, pp. 4369–4376. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.076
148. Williams G.D., Pinto A.K., Doll B., Boon A.C.M. A North American H7N3 influenza virus supports reassortment with 2009 pandemic H1N1 and induces disease in mice without prior adaptation. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 9, pp. 4796–4806. doi: 10.1128/JVI.02761-15
149. Wolkerstorfer A., Katinger D., Romanova J. Factors affecting the immunogenicity of the live attenuated influenza vaccine produced in continuous cell line. *MIR Journal*, 2016, vol. 3, pp. 13–24. doi: 10.18527/2500-2236-2016-3-1-13-24
150. Yamashita M., Krystal M., Fitch W.M., Palese P. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology*, 1988, vol. 163, no. 1, pp. 112–122. doi: 10.1016/0042-6822(88)90238-3
151. Yang G., Ojha C.R., Russell C.J. Relationship between hemagglutinin stability and influenza virus persistence after exposure to low pH or supraphysiological heating. *PLoS Pathog*, 2021, vol. 17, no. 9: e1009910. doi: 10.1371/journal.ppat.1009910
152. Yang J.R., Huang Y.P., Chang F.Y., Hsu L.C., Lin Y.C., Huang H.Y., Wu F.T., Wu H.S., Liu M.T. Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011–2012, Taiwan. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 10: e47179. doi: 10.1371/journal.pone.0047179
153. Zaraket H., Dbaibo G., Salam O., Saito R., Suzuki H. Influenza virus infections in Lebanese children in the 2007–2008 season. *Jpn J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 62, no. 2, pp. 137–138.

Авторы:

Киселева И.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ларионова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Желтухина А.И., младший научный сотрудник отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kiseleva I.V., DSc (Biology), Professor, Head of Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Larionova N.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Zheltukhina A.I., Junior Researcher, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.03.2024
Принята к печати 09.08.2024

Received 25.03.2024
Accepted 09.08.2024

BIOLOGICAL FEATURES AND MEDICAL SIGNIFICANCE OF THE *LISTERIA* BACTERIA

I.A. Derevyanchenko^{a,b}, L.A. Kraeva^{a,c}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Eastern Branch of the Center of Hygiene and Epidemiology in the city of St. Petersburg and the Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation

^c Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Peterburg, Russian Federation

Abstract. Bacteria of the genus *Listeria* are widely distributed in the environment; they are isolated from soil and water ecosystems, food products, environmental objects, and circulate *in vivo*. *L. monocytogenes* are pathogenic for animals and humans. The ecological plasticity, stress resistance and tolerance of *Listeria* determines their ability to switch from a saprophytic to a parasitic life cycle and survive under various environmental conditions. After thawing and subsequent cultivation of *Listeria* on fresh nutrient medium, a pronounced populational heteromorphism is noted: formation of protoplast-type cells, L-forms and convoluted revertant cells, which requires the use PCR and ELISA for bacteria detection. It is known that non-pathogenic *Listeria*, as well as pathogenic microorganisms forming a biocenosis with *L. monocytogenes*, can serve as a reservoir of pathogenicity and resistance determinants and be transferred to pathogenic *Listeria* by horizontal transfer, which leads to the emergence of new, more virulent and antibiotic-resistant strains. In addition, the most important adaptation mechanism of *L. monocytogenes* to adverse environmental factors is their ability to form biofilms markedly enhancing survival and disinfectant resistance. The relatively high genomic similarity between *L. monocytogenes* and some non-pathogenic *Listeria* species and often their coexistence in similar ecological niches, may provide an opportunity for the transfer of resistance or virulence genes. At the same time, the transmission of pathogenicity genes from *L. monocytogenes* to *L. innocua* is also possible, which predetermines the appearance of atypical hemolytic pathogenic strains, which, given the greater environmental prevalence of the latter can pose a great danger to humans and animals. The increasing role of *Listeria* in the pattern of human and animal infectious pathologies, the variability of their morphological, cultivable and biochemical properties, as well as the constant modification of the surface *Listeria* antigens underlies a need to improve listeriosis diagnostics and requires creation of new immunobiological preparations and modern regimens for isolation and identification of various *Listeria* types. This review discusses current views on *Listeria* spp. prevalence and biological qualities, virulence and pathogenicity factors of *L. monocytogenes*, as well as methods for identifying different *Listeria* species.

Key words: bacteria, *Listeria*, listeriosis, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, pathogenicity.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И МЕДИЦИНСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA*

Деревянченко И.А.^{1,2}, Краева Л.А.^{1,3}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Восточной филиал ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге и Ленинградской области, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Бактерии рода *Listeria* широко распространены в окружающей среде, выделяются из почвенных и водных экосистем, продуктов питания, объектов внешней среды, циркулируют в организме. Некоторые их виды, прежде всего, *L. monocytogenes*, являются патогенными для человека и животных. Экологическая пластичность, стрессо-

Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85. Факс: 8 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Contacts:

Lydmila A. Kraeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85. Fax: +7 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Для цитирования:

Деревянченко И.А., Краева Л.А. Биологические особенности и медицинская значимость бактерий рода *Listeria* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 862–880. doi: 10.15789/2220-7619-BFA-17639

Citation:

Derevyanchenko I.A., Kraeva L.A. Biological features and medical significance of the *Listeria* bacteria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 862–880. doi: 10.15789/2220-7619-BFA-17639

© Derevyanchenko I.A., Kraeva L.A., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-BFA-17639>

устойчивость и толерантность листерий обуславливает их способность переходить от сапрофитного к паразитическому образу жизни и снова реверсировать к сапрофитизму при попадании в окружающую среду и выживать при различных ее условиях. При этом выявлено, что после размораживания и последующего культивирования листерий на свежих питательных средах отмечается выраженный гетероморфизм популяции, в том числе образование клеток протопластного типа, L-форм и извитых клеток-ревертантов, что усложняет их обнаружение и типирование в размороженных пищевых продуктах и требует применения таких методов обнаружения бактерий, как ПЦР и ИФА. Известно, что непатогенные листерии, а также патогенные микроорганизмы, образующие биоценоз с *L. monocytogenes*, могут служить резервуаром детерминант патогенности и резистентности и быть переданы патогенным листериям путем горизонтального переноса, что обуславливает появление новых более вирулентных и патогенных, а также резистентных к антибиотикам штаммов. Кроме того, важнейшим механизмом адаптации *L. monocytogenes* к неблагоприятным факторам окружающей среды является их способность к образованию биопленок, существенно повышающих выживаемость и устойчивость к дезинфектантам. Сравнительно высокое геномное сходство между *L. monocytogenes* и некоторыми непатогенными видами листерий, в том числе *L. innocua*, и зачастую их сосуществование в сходных экологических нишах может предоставить возможность для переноса генов устойчивости или вирулентности и обуславливает возможность создания у *L. innocua* резервуаров генов устойчивости, которые могут передаваться бактериям *L. monocytogenes*. В то же время, возможна передача генов патогенности от *L. monocytogenes* к *L. innocua*, что предопределяет появление атипичных гемолитических патогенных штаммов, которые, учитывая более широкое распространенное *L. innocua* в окружающей среде, могут представлять большую опасность для человека и животных. Увеличение роли листерий в структуре инфекционных патологий человека и животных, изменчивость их морфологических, культуральных и биохимических свойств, а также постоянная модификация поверхностных антигенов листерий предопределяет необходимость совершенствования диагностики листериоза и требует создания новых иммунобиологических препаратов и современных схем для выделения и идентификации различных видов листерий. В настоящем обзоре рассматриваются современные представления относительно распространенности и биологических свойств *Listeria* spp., факторов вирулентности и патогенности *L. monocytogenes*, а также методов идентификации листерий разных видов.

Ключевые слова: бактерии, листерии, листериоз, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, патогенность.

Introduction

It is known that bacteria of the genus *Listeria* can cause listeriosis, a severe infectious disease of humans and animals characterised by polymorphic clinical manifestations, high mortality (up to 20–40% among adults and more than 50% in newborns) [28] and often complicated by meningoencephalitis [97]. At the same time, while previously only *L. monocytogenes* was considered pathogenic for humans, the literature has recently begun to describe cases of listeriosis infection caused by other *Listeria* species, including *L. ivanovii* [66], *L. seeligeri* [140], *L. innocua* [103], *L. welshimeri* [43], and *L. grayi* [150].

In general, it is currently accepted that *L. monocytogenes* is the etiological agent of listeriosis in humans and many vertebrate species, including birds, whereas *L. ivanovii* causes infections mainly in ruminants [106].

The epidemic situation of listeriosis worldwide continues to worsen due to a number of reasons, including the unique plasticity of *Listeria* and its ability not only to persist but also to multiply in infected products even at low temperatures (+4...+7°C, typical of a refrigerator) [120], acidic environments [124], high salt concentrations [88], and under oxygen-deficient conditions (in vacuum-packed finished products) [45].

At the same time, one unfavourable external factor can increase the resistance of *Listeria* to others. For example, incubation of *L. monocytogenes* at low

temperatures was found to increase its resistance to osmotic stress [115]. Similarly, high salt concentrations in the incubation medium can lead to cross-protection of *L. monocytogenes* against other causes of cell death including high temperature, acidity and oxidative stress [128]. It has been revealed that cultivation of *L. monocytogenes* under conditions of vacuum packing and low temperature (+6°C), regardless of the nutrient substrate, causes the formation of a capsule in the pathogen and the emergence of resistance to some antibiotics from the penicillin group [41]. In addition, under unfavourable conditions, *Listeria* are capable of forming biofilms that attach to abiotic or biological surfaces and serve as a survival strategy for the bacteria, allowing them to persist in unfavourable conditions, being protected from the human immune system and various environmental factors (ultraviolet light, acids, drying, salinity, antimicrobial agents, disinfectants) [46].

The extremely high tolerance of *L. monocytogenes* to stress conditions causes a serious problem of listeriosis in the food industry, and the increasing role of *Listeria* in the structure of infectious pathologies of humans and animals predetermines the need to improve the diagnosis, prevention and sanitary and epidemiological surveillance of listeriosis, which requires the creation of new immunobiological preparations and modern schemes for the isolation and identification of various *Listeria* species.

The present review discusses the current understanding of the prevalence and biological properties

of *Listeria* spp. and the virulence and pathogenicity factors of *L. monocytogenes*, as well as methods of identification of *Listeria* species.

The prevalence and biological properties of species of the *Listeria* genus

Listeria spp. are gram-positive flagellated bacilli-form bacteria, facultative anaerobes that do not form spores and are motile at low temperatures [68], are widely distributed in the environment, isolated from soil and aquatic ecosystems, food, and environmental objects, circulate in the body, and some of their species are pathogenic for humans and animals [137].

Initially (until 2009), 7 species were identified in the genus *Listeria* (Pirie, 1940): *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, and *L. welshimeri*, of which *L. monocytogenes*, the main causative agent of listeriosis, poses the greatest threat to humans. In the last decade, due to the rapid development of sequencing technologies, 13 new species with diverse phenotypic and genotypic characteristics have been identified within the genus *Listeria*: *L. marthii* [83], *L. rocourtiae* [100], *L. fleischmannii* [47], *L. weihenstephanensis* [99], *L. riparia* [64], *L. grandensis* [64], *L. floridensis* [64], *L. cornellensis* [64], *L. aquatica* [64], *L. newyorkensis* [141], *L. booriae* [141], *L. costaricensis* [123] and *L. goaensis* [68]. In addition, two subspecies, subsp. *fleischmannii* and subsp. *colouradonensis*, have been established within the species *L. fleischmannii* [65].

Phylogenetic studies based on the 16S and 23S rRNA sequences revealed that the genus *Listeria* includes two evolutionarily formed lineages: *Listeria* sensu strictu, which includes *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, and *L. marthii*, and *Listeria* sensu lato, which unites *L. grayi*, previously considered nonpathogenic, and 12 new *Listeria* species discovered since 2009 [58, 126]. All 6 species of *Listeria* sensu strictu share common phenotypic characteristics, such as the ability to grow at low temperatures and flagellar motility, whereas the 11 species of *Listeria* sensu lato represent three distinct monophyletic groups that can be recognised as separate genera [126]. These three putative genera of *Listeria* are immobile (except *L. grayi*), capable of nitrate reduction (except *L. floridensis*) and give a negative result in the Voges–Proskauer test (except *L. grayi*) [126]. Unlike all other *Listeria* species, species of the proposed new genus *Mesolisteria* cannot grow at temperatures below 7°C [126].

The prevalence of *Listeria* in the environment

The main source and reservoir of *Listeria* are environmental objects, primarily soil. *Listeria* is also excreted from plants, silage, dust, water bodies and

sewage [26]. There are 92 known animal species that serve as reservoirs or participate in the circulation of *Listeria*. The spread of the pathogen is particularly intensive during the period of rodent migration to places of their concentration (haystacks, hayfields). Rodents play a leading role in the transmission of *Listeria* to farm animals by contaminating feed and water [22]. Transmission of the pathogen between rodents in natural foci is supported by arthropods, including mites.

In addition, *Listeria* can be present in water in the environment, and therefore infection of animals through water is possible [33], including live fish, on whose body surface *Listeria* can multiply using the esculin of the mucus covering the scales as a food source [25]; cold smoking of fish creates specific conditions (salt, smoking solution) that favour *Listeria* multiplication [85]. *Listeria* can multiply in water and in soil microecosystems at low temperature with preservation of virulence of populations [37], which determines the spread and long-term persistence of *Listeria* in the external environment and economic objects.

Ecological plasticity and tolerance of *Listeria* stipulates their ability to switch from saprophytic to parasitic lifestyle and to reverse to saprophyticism again when introduced into the environment and survive under its various conditions. *Listeria* concentration has been found to increase in the external environment in autumn and spring, stabilise in winter and decrease in summer [7]. In addition, the ability of *Listeria* to actively multiply in melt water (at a temperature of 6°C) has been revealed, providing a 2-fold increase in bacterial mass [7]. At the same time, no significant changes in cell morphology in the population were observed when *Listeria* survived at low temperatures, including sub-zero temperatures, but after thawing and subsequent cultivation on fresh nutrient media, a pronounced heteromorphism of the *Listeria* population was observed, including the formation of protoplast-type cells, L-forms, and twisted revertant cells [5]. In this regard, the detection of *Listeria* in unfrozen food products requires, firstly, a long time for reversion in enrichment medium, and, secondly, there is a need to apply bacterial detection methods such as DNA diagnosis, PCR and ELISA.

The ability of *Listeria* to remain viable on food-contact surfaces in packinghouses has been revealed, which predetermines the likelihood of contamination of food products, including fruit, with a subsequent increase in the abundance of these bacteria as the products are stored [141]. In addition, there has recently been a steady increase in the proportion of multiple antibiotic-resistant *L. monocytogenes* strains worldwide [44], with additional pathogenicity factors [18].

In addition to abiotic factors, *Listeria* biology is also influenced by biotic environmental factors, including saprophytic microorganisms that contaminate food products, form common biocenoses with *Listeria*, and influence *Listeria* through exogenous

metabolites or competition for nutrient substrates [36]. Nonpathogenic *Listeria*, as well as pathogenic microorganisms that form a biocenosis with *L. monocytogenes*, can serve as a reservoir of pathogenicity and resistance determinants and can be transmitted to pathogenic *Listeria* by horizontal transfer [9].

L. monocytogenes and *L. innocua* are the most common species of the genus *Listeria*, related in a strict sense [94] and often co-exist in environmental sites. It was initially hypothesised that the two species evolved from a common ancestor but differ due to the loss of virulence genes in *L. innocua* [55]. It was later hypothesised that *L. innocua* evolved from the ancestors of four strains of the *L. monocytogenes* serogroup and may have retained some characteristics of its ancestor [116]. Atypical *L. innocua* was found to induce a protective immune response against *L. monocytogenes*, which is also in favour of a close genetic relationship between *L. innocua* and *L. monocytogenes* [111].

Genetically close to these two species is *L. welshimeri*, which is characterised by a smaller genome size compared to *L. monocytogenes*, suggesting similar evolutionary pathways of their genomes from a common ancestor [86]. However, the genome of the ancestor of *L. welshimeri* was more compact than that of *L. monocytogenes*, which led to the emergence of non-pathogenic species of *Listeria* spp. [86]. At the same time, the *prfA* virulence gene cluster present in the common ancestor of *Listeria* species was eventually lost in *L. innocua* and *L. welshimeri* [94, 116].

The bacteria of *L. welshimeri* species are found in meat products and *L. seeligeri* in fish [17]. *L. innocua* is the predominant species in seawater, especially in coastal waters, compared to other *Listeria* species, which may cause contamination of fish, squid, crustaceans and other animals (seafood) and pose a risk to humans [74]. Bacteria of this species are often found in meat (frozen minced meat and semi-finished products, as well as smoked products ready for consumption), fish (salted, raw smoked fish, chilled and frozen semi-finished products), vegetables (onions, cabbage, potatoes, beetroot) stored in vegetable warehouses [17, 73], and are capable of adaptation in changing environmental conditions (survival in a wide range of temperature, humidity, pH of the environment), which significantly increases their chances of survival in different environmental conditions, causes their widespread active distribution and promotes the emergence of strains with atypical properties [59]. Thus, in addition to food products, *L. innocua* species are often present in silage and organs of rodents [17]. *L. innocua* have dual nature and are capable of both saprophytic and parasitic lifestyle depending on the habitat [15].

Bacteria of *L. monocytogenes* species were first isolated and described in 1911 by the Swedish scientist G. Hulphers from purulent pus. Hulphers from a purulent nodule of the liver of a fallen rabbit [93], and

a precise and detailed description of listeriosis was made in 1923 by E. Murray et al. [119]. The first documented culture of the pathogen in humans was isolated in France in 1921 by Dumont and Cotoni from a patient with meningitis, and its modern name was given in 1940 in honour of the English surgeon J. Lister, the founder of antiseptic methods. Despite the fact that *L. monocytogenes* is the main causative agent of listeriosis in humans, it is typical of the normal microflora of the middle and lower intestinal tracts of many animal and human species [54]; therefore, it may be excreted with faeces into the environment and subsequently contaminate soil, water, grass, etc.

The relatively high genomic similarity between *L. innocua* and *L. monocytogenes*, and sometimes their coexistence in similar ecological niches, may provide an opportunity for horizontal transfer of resistance or virulence genes [102]. And, in particular, although antimicrobial resistance is less common in *L. monocytogenes* than in *L. innocua*, but *L. innocua* may form a reservoir of resistance genes that can be transferred between bacterial species, including transferring them to pathogenic *L. monocytogenes* [81]. In addition, the possibility of transferring antibiotic resistance genes to *Listeria* spp. from enterococci via transposons is also accepted [92].

Biological properties of *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. ivanovii*

Morphologically, *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. ivanovii* are short, gram-positive, non-spore-forming bacilli of regular shape and are facultative anaerobes [26]. However, *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* can transform into L-forms and parasitise intracellularly [26], showing the ability to survive in macrophages and infiltrate a number of normally non-phagocytic cells such as epithelial cells, hepatocytes and endothelial cells [139].

L. monocytogenes exhibits the ability to grow in a wide range of temperatures (1–45°C, with the optimum temperature for their growth being 30–37°C) and pH (from 4.0–4.8 to 9.5–10.0) in the presence of NaCl (20%) and 15% CO₂ [11]. At 70°C, *Listeria* die within half an hour and at 100°C within 3–5 minutes [34].

L. monocytogenes is able to remain viable when stored in semi-liquid nutrient medium and lyophilised under refrigerator conditions [4]. In this regard, dairy products with a long shelf life, including soft cheeses, ice cream and butter, are the most dangerous source of listeriosis, as they multiply at low temperatures and accumulate dangerous doses of *Listeria* in milk [18]. In addition, *L. monocytogenes* is detected not only in raw products, but also in cooked, uncooked and raw smoked meat products, frozen, pickled and preserved seafood, as well as various semi-finished products [144].

The high thermostability of *Listeria* is due to the presence of a complex of genetic and biochemical mechanisms that allow them to adapt to changing temperature conditions and survive in many environmental objects. One of the mechanisms of thermoadaptation is the induction and repression of genes acting at the isoenzyme level, regulating the launch of synthesis of "cold" and "heat" isoenzymes. Moreover, the number of "cold" isoenzymes in *Listeria* significantly exceeds the number of "thermal" isoenzymes, which makes *Listeria* facultative psychrophiles. The most important mechanism of adaptation of *Listeria* to unfavourable environmental factors is their ability to form biofilms, which significantly increase survival and resistance to disinfectants [134].

The wide range of host organisms in which *L. monocytogenes* can reproduce has caused antigenic heterogeneity of its outer envelope [23]. Thus, using molecular typing methods, it is possible to distinguish within the species of *L. monocytogenes*, three evolutionary lineages can be distinguished within the *L. monocytogenes* species, characterised by different pathogenic potentials: Lineage I are strains associated with epidemic outbreaks of listeriosis (serotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d and 4e); Lineage II are strains isolated during sporadic cases of listeriosis (serotypes 1/2a, 1/2c, 3a and 3c); Lineage III are strains rarely associated with cases of listeriosis (serotypes 4a and 4c) and Lineage IV (4a, 4b, 4c) [107, 126, 131]. The most common serotypes of *L. monocytogenes* in listeriosis patients are 4b, 1/2a, 1/2b [14]. At the same time, about half of all cases of listeriosis in the world are caused by strains of serovar 4b, whereas serovariants 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 3a are most often detected in infected products and natural environment [58, 104, 105].

At the same time, no regularities between the biological type of the host and the serovars of the isolated strains or the severity of the disease have been found. At the same time, it has been established that the course of the pathological process and host specificity are determined by listeriolysin and internalins A and B, which act as pathogenicity factors of *Listeria* [38, 126]. It has been found that DNA regions encoding *Listeria* pathogenicity factors are more frequently found in strains of serovar 4b [118].

Intraspecific cross-reactions are characteristic of *Listeria*: in particular, a culture containing DNA fragments characteristic of other serovariants was isolated within serovariant 4b [101]. In addition to intraspecies cross-reactions, *Listeria* also cross-reacts serologically with typhoid-paratyphoid bacteria and staphylococci [10].

The most genetically similar species to *L. monocytogenes* is *L. innocua*, which serves as an indicator of the possible presence of *L. monocytogenes* in products and can be pathogenic not only to animals [139], but also to humans [117].

The bacteria of *L. innocua* species are characterised by stability of phenotypic manifestations: mor-

phology (short, randomly arranged bacilli, coccoid forms and ovoid bacteria that stain positively according to Gram stain), blue or bluish-green luminescence in oblique light, typical growth of colonies on nutrient media with a characteristic fermented milk odour, presence of catalase and absence of oxidase activity, motility at temperatures of 22°C and 37°C. Bacteria of this species are catalase-positive, most cultures show DNAase activity, and some strains are characterised by haemolytic activity [15]. In addition, bacteria of the *L. innocua* species are characterised by the presence of a gene encoding lecithinase, typical of *L. monocytogenes* [82], but not typical of *L. monocytogenes*, which retains lecithinase activity when cultured on nutrient medium containing lecithin, both in the presence and absence of activated carbon [21]. *L. innocua* is sensitive to penicillins, aminoglycosides, carbapenems, fluoroquinolones, but resistant to nalidixic acid [15].

A peculiarity of *L. innocua* is the variability of biochemical activity. Thus, some experts [15] have established the ability of *L. innocua* to degrade glucose, salicin, rhamnose, mannose, maltose, esculin and fructose, along with the absence of degradation of urea, dulcitol, inulin, adonitol, raffinose, melibiose, starch and arabinose. The study of pathogenicity factors in some cultures of *L. innocua*, especially those isolated from fish, revealed haemolytic activity uncharacteristic for bacteria of this species [15], indicating the appearance of atypical strains and possibly due to the appearance of gene clusters similar to *L. monocytogenes* in the genome of *L. innocua* [59].

Although *L. monocytogenes* and *L. innocua* differ markedly in virulence, they are virtually indistinguishable by classical taxonomic criteria. Both species are actively motile and produce flagellin abundantly at 22°C. However, these species differ in motility and flagellin production at 37°C. At this temperature, *L. monocytogenes* strains are virtually immobile and produce little or no flagellin, whereas *L. innocua* strains are often motile and produce significant amounts of flagellin [95]. These data point in favour of differential regulation of flagellin production in *L. monocytogenes* and *L. innocua* at 37°C.

L. monocytogenes strains are characterised by the presence of both somatic O and flagellar H-antigens, whereas *L. ivanovii* (serotype 5) and *L. innocua* (serotype 6) have only one somatic O-antigen each [42].

Biological properties of other *Listeria* species

Phenotypic properties of other species of the genus *Listeria*: *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* are not sufficiently defined, and in some respects are similar to *L. monocytogenes* bacteria, which may lead to inaccurate identification. Thus, it is known that the new *Listeria* species do not differ from *L. monocytogenes* and are short ba-

cilli of regular shape with rounded ends, sometimes almost cocci, gram-positive, capsules and spores do not form, they are not resistant to acid, aerobes, facultative anaerobes, chemoorganoautotrophs, but in the external environment are chemolithoautotrophs, catalase-positive, oxidase-negative, exhibit motility at 20–25°C [8].

Bacteria of *L. marthii* species grow well on conventional nutrient media in the temperature range of 1–45°C, the optimal temperature is 30–37°C. They are motile, form an umbrella of 3–5 mm in semi-liquid agar at 20–30°C and do not form it at 37°C. Nonhemolytic, hydrolyse esculin, produce hydrogen sulfide, tolerant to sodium chloride, positive for methyl red, ferment D-glucose, lactose and maltose; do not ferment D-xylose, D-mannite, sucrose and L-rhamnose, reduce nitrates, active against urease, form indole and hydrolyse gelatin. On dense media, after incubation for 24 hours at 37°C, colonies 0.2–0.8 mm in diameter, smooth, bluish-green, translucent, slightly raised with a fine surface texture and a smooth edge grow. The type strain is FSL S4-120T [83].

Colonies of *L. rocourtiae* species after 48 h of cultivation at 30°C grow on trypticase-soya agar 0.5–1.0 mm in diameter, round, translucent, convex with a fine surface texture and a smooth edge. They reduce nitrate and manite, do not exhibit haemolytic activity, are able to degrade to acid ribose, D-xylose, galactose, glycerol, erythritol, adonite, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, methyl-D-glucoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, starch, trehalose, glycogen and D-raffinose. It does not ferment L-xylose, D-arabinose, L-arabinose, methyl-D-mannoside, sucrose, inulin, melecitose, L-fructose, xylitol, D-turanose, D-fructose, D-tagatose, D-arabitol, 5-ketogluconate or 2-ketogluconate. The type strain is CIP 109804 (DSM 22097) [100].

The bacteria of *L. fleischmannii* species are typical short bacilli arranged singly or in short chains (0.4–0.6 mm diameter and 0.7–1.2 mm length). On nutrient agar at 37°C after 24 hours, colonies grow 0.4–1.0 mm in diameter, translucent, round, with a low convex surface and smooth edges. Immobile, although they contain the flagellin *flaA* gene. Reduce nitrate, hydrolyse hippurate and esculin, and produce hydrogen sulphide. The main differentiating character that distinguishes this species from others is the unique ability to ferment D-mannite and D-xylose. The species *L. fleischmannii* is non-haemolytic, does not invade Caco-2 cells and does not contain *Listeria* virulence genes on pathogenic islet 1. The type strain is LU2006-1T (DSM 24998) [47]. Based on molecular genetic studies, the species *L. fleischmannii* was divided into subspecies according to genomic characteristics: *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii* and *L. fleischmannii* subsp. *colouradonensis* [65].

Bacteria of the subspecies *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii* are characterised by an optimal growth temperature of 30–37°C, are immobile at 25°C, are non-haemolytic, reduce nitrate, and degrade D-xylose to acid, D-arabitol, L-rhamnose, α -methyl-D-glucoside, D-ribose, turanose, sucrose and melecitose, and do not ferment glucose-1-phosphate, inositol, arylamidase, α -mannosidase and D-tagatose. The typical strain is LU2006-1 [65].

Bacteria of the subspecies *L. fleischmannii* subsp. *soloradonensis* are characterised by similar phenotypic features to the subspecies *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, but differ from it in their inability to ferment sucrose, melecitose, and turanose, but ferment inositol. The type strain is TTU M1-001 [47, 65]. The genomes of both subspecies of *Listeria fleischmannii* contain putative enhancin genes; a mosquitocidal toxin has been identified in the genome of *Listeria fleischmannii* subsp. *colouradonensis*, suggesting possible adaptation to insect habitation [47, 65].

Bacteria of *L. weihenstephanensis* species are non-haemolytic bacilli 0.4–0.5 mm in diameter and 2.0–4.5 mm in length with rounded ends; colonies 1.0–2.5 mm in diameter, translucent, whitish, round, smooth, slightly convex with slightly irregular edges grow on trypticase-soya agar. The optimum temperature for their growth is 28–34°C, they do not grow at 38°C, their mobility is weak at 15–30°C, the optimum pH is 7–8. Isolates can grow in broth at 3°C for 10 days in anaerobic conditions. They grow well in nutrient broth containing 6.5% NaCl. Test positive with methyl red, negative with Voges–Proskauer and CAMP test, do not hydrolyse urea and do not form indole and hydrogen sulphide, reduce nitrate to nitrite. Do not ferment α -mannosidase, arylamidase, D-ribose, 1-phosphate-glucose and D-tagatose. Esculin, D-arabitol, D-xylose, L-rhamnose and methyl-D-glucopyranoside are fermented [99]. After 14 days of anaerobic incubation, acid formation is noted from glycerol, D-ribose, D-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, inositol, D-mannite, and methyl-D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, aequulin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, trehalose, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-arabitol and potassium 5-ketogluconate. Not able to degrade erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-galactose, L-xylose, D-adonite, L-sorbose, methyl-D-xylopyranoside, dulcitol, D-sorbitol, methyl-D-mannopyranoside to acid, melibiose, sucrose, inulin, melecitose, raffinose, turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, L-arabitol, potassium 2-ketogluconate and potassium gluconate [99].

Bacteria of *L. floridensis* species are morphologically bacilli with rounded ends, 0.6 × 1.3–1.9 mm in size, unable to grow at temperatures below 7°C. The optimum temperature for their growth is 37–41°C; they do not show motility at temperatures of 4, 22, 30 and 37°C. The species *L. floridensis* is the only species of the genus *Listeria* lacking motility and

unable to reduce nitrate, characterised by negative Voges–Proskauer reaction and CAMP test. The typical strain is FSL S10–1187 [64].

The bacteria of *L. aquatica* species are 0.6–0.7 × 1.5–2.4 mm in size, like *L. floridensis* are unable to grow at temperatures below 7°C, and the optimal temperature for them is 37–41°C, are not motile at 4, 22, 30 and 37°C, and show negative Voges–Proskauer reaction and CAMP test. Unlike *L. floridensis*, they reduce nitrate but do not reduce nitrite, do not ferment maltose but are able to ferment D-tagatose. The typical strain is FSL S10–1188 [64].

Bacteria of *L. riparia* species are straight bacilli with rounded ends, measuring 0.5–0.7 × 2.3–3.7 mm. Like *L. floridensis* and *L. aquatica*, they do not grow at 7°C and below, their optimum temperature is 37–41°C, are not motile at 4, 22, 30 and 37°C, and show negative Voges–Proskauer reaction and CAMP test. Similar to *L. aquatica* and unlike *L. floridensis*, they reduce nitrate and do not reduce nitrite. The main differential characteristic from other species of the genus *Listeria* is the ability to ferment L-rhamnose, mannose, D-galactose and L-arabinose. The typical strain is FSL S10–1204 [64].

The species *L. cornellensis* is represented by straight sticks with rounded ends, measuring 0.4–0.7 × 2.4–3.8 mm. The optimum temperature for their growth is 30–37°C, they are not motile at 4, 22, 30 and 37°C, exhibit negative Voges–Proskauer reaction and CAMP test. They reduce nitrate and do not reduce nitrite. Phenotypic traits resemble the species *L. grandensis*. The typical strain is TTU A1–0210 [64].

Phenotypically similar to *L. cornellensis* are bacteria of *L. grandensis* species, which morphologically are straight bacilli with rounded ends, 0.6–0.7 × 2.0–3.1 mm in size. Their optimum growth temperature is 30–37°C, and they are immobile at temperatures of 4, 22, 30 and 37°C. Voges–Proskauer reaction and CAMP test are negative. Reduces nitrate and does not reduce nitrite. The type strain is TTU A1–0212 [64]. In addition, *L. cornellensis* and *L. grandensis* are the only species of *Lisretia* unable to cleave L-rhamnose. At the same time, *L. cornellensis* differs from *L. grandensis* species in its weak lactose cleavage [64].

Bacteria of *L. newyorkensis* species are immobile at all temperatures, able to grow in the temperature range of 4–41°C, the optimal temperature for their growth is 30–37°C. Able to reduce nitrate but do not ferment nitrite. Show positive reaction with methyl red, Voges–Proskauer test negative, unable to ferment xylitol, D-fructose, α-mannosidase, D-arabitol, but do ferment D-galactose, D-ribose and L-arabinose. The typical strain is FSL M6–0635 [152].

Bacteria of the species *L. booriae* are non-haemolytic bacilli, non-motile at all temperatures and capable of growth between 4–41°C, the optimum temperature for growth is 30–41°C. They differ from other species in their ability to ferment D-arabitol, melibiose and L-arabinose. The typical strain is FSL A5–0281 [152].

The species *L. costaricensis* shows the greatest similarity in the structure of 16S rRNA genes with the type strain *L. floridensis* (98.7%), which allowed us to assign it to the same branch as *L. fleishmannii*, *L. floridensis* and *Listeria sensu lato*. The typical strain is CLIP 2016/00682 [123].

L. goaensis are short non-spore-forming gram-positive immobile bacilli, oxidase-negative, catalase-positive and exhibit the ability to α-haemolysis on dishes with 5% agar with sheep and horse blood [68].

Thus, bacteria of the genus *Listeria* are ubiquitous and have a wide adaptive capacity that allows them to adapt to existence in different environments and, at the same time, to acquire various uncharacteristic properties. In this regard, knowledge of phenotypic features of biological properties of different *Listeria* species may be useful in determining approaches to the detection of epidemically dangerous *Listeria* from a variety of environmental objects.

Pathogenicity factors of *L. monocytogenes*

Currently, *L. monocytogenes* serves as a model system for studying the main aspects of intracellular pathogenesis, as its ability to parasitise in the cytosol of mammalian cells, to use the actin-based motility system and to spread from cell to cell, avoiding contact with the humoral immune system [150], to overcome three principal protective barriers on the way of spreading in the body has been established: to penetrate through intestinal enterocytes, entering the blood and lymph, and to overcome the blood-brain barrier and placental barrier [63]. At the same time, *L. monocytogenes* is able to penetrate into target cells by phagocytosis, including it in those cells for which it is not characteristic, and, as a result, to affect various cell types, suppressing at the initial stages of infection the Th1-type immune response, which is the main one for the elimination of intracellular parasites, which significantly complicates the organism's fight against this pathogen [1].

The most typical features of *L. monocytogenes* are an exceptionally large number of surface proteins, an abundance of transport proteins, in particular proteins designed for carbohydrate transport, and a variety of regulatory proteins [50].

Surface proteins play an important role in the interactions of the microorganism with the environment, including target cells during infection of the host organism. In this case, the main virulence factors of *L. monocytogenes* are such surface proteins as internalins A and B, necessary for penetration into eukaryotic cells, and *actA*, which plays a key role in actin-based motility [50].

Pathogenicity islands identified in the *L. monocytogenes* genome are LIPI-1 (*prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl* and *actA*) regulated by the PrfA protein [78], LIPI-2 (inlABCJ) [151], LIPI-3 (IlsAXXGHH-BYDP) [57] and LIPI-4 (licABC, Im900558-70013

and *glvA*) [154]. It has been found that the presence of the pathogenicity island LIPI-3 in the genome of the bacterium causes a high level of its virulence and is often accompanied by the development of the meningoencephalic form of the disease [3].

The pathogenesis of *L. monocytogenes* requires the coordinated expression of six genes, namely *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* and *plcB*, which are mainly localised to the pathogenicity island LIPI-1 [150] regulated by the transcription regulator PrfA [56]. The processes activated by PrfA are crucial for the infection cycle of *L. monocytogenes*. They include phagosome lysis with release of bacteria into the cytoplasm and actin-dependent intercellular mobility of bacteria [77]. For example, the *prfA* gene encodes the transcription activator PrfA, which directly or indirectly induces the transcription of more than 140 genes, including the other five genes found in LIPI-1 [129]. The *plcA* and *plcB* genes encode phospholipases C, which in combination with listeriolysin O (LLO) protect bacteria from cytoplasmic phagosomes [143]. The *mpl* gene encodes a zinc-metalloprotease required for pro-*plcB* maturation [134], and the *actA* gene product is a multifunctional virulence factor [149].

Auxiliary, or minor, virulence factors of *L. monocytogenes* are the products of 13 genes, 5 of which are associated with bacterial adhesion to and/or invasion into mammalian cells. The *iap* (invasion-associated p protein) gene encodes the extracellular protein p60, which has murein hydrolase activity and is required for bacterial division and invasion into target cells [150]. The *lpeA* gene encodes a protein that belongs to the lipoprotein receptor associated antigen I (LraI) superfamily. LraI proteins, in turn, are associated with the bacterial surface and include several adhesion proteins of many gram-positive pathogenic bacteria, such as the adhesins PsaA, also typical of *Streptococcus pneumoniae*, FimA, typical of *Streptococcus parasanguinis*, and EfmA, also characteristic of *Enterococcus faecium* [110]. The *lpeA* gene also encodes the extracellular domain of SBP ("Streptococcal solute binding proteins"), which in *L. monocytogenes* binds Zn^{2+} and Mn^{2+} and mediates entry into eukaryotic cells, including hepatocytes and macrophages [135].

The *lpsA* gene encodes a protein of the same name, which is a type II signal peptidase required for *lpeA* maturation [136], with genetic defects in *lpsA* causing improper maturation of *lpeA*, subsequent loss of its proper surface localisation and ultimately a significant weakening of *L. monocytogenes* virulence.

The *lap* gene encoding a protein of the same name (*Listeria* adhesion protein p) promotes adhesion to intestinal epithelial cells and facilitates extraintestinal dissemination of bacteria [51]. Specifically, the *lap* gene product interacts with its cognate host cell receptor, heat shock protein 60 (Hsp60) on the apical side and causes dysfunction of the epithelial barrier, which favours translocation of *L. monocytogenes* across

it [71]. *Lap* is an alcohol acetaldehyde dehydrogenase (Imol634) present in both pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species [91]. However, *lap* exhibits virulent properties only in pathogenic *Listeria* due to the lack of secretion and surface reassociation of *lap* in non-pathogenic species [52, 91]. The interaction of *lap* with the host cell receptor Hsp60 leads to activation and nuclear translocation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), which causes activation of myosin light chain kinase (MLCK) [71]. Activated MLCK phosphorylates myosin light chain (MLC), which predisposes cellular redistribution of tight junction proteins (claudin-1 and occludin) and adhesive junction protein (E-cadherin) and opening of the intercellular junction [71]. Consequently, *L. monocytogenes* performs efficient translocation across the intestinal barrier by activating the Lap-Hsp60-NF- κ B-MLCK axis [70].

The *fbpA* gene encodes an adhesin containing fibronectin-binding domains; this protein provides adhesion to target cells, especially hepatocytes [127].

The genome of *L. monocytogenes* also contains genes encoding enzymes that protect bacteria from the host immune system or increase their survival in the cytosol of infected cells. For example, the *pdgA* and *oatA* genes (peptidoglycan-N-deacetylase and O-acetylase, respectively) may be required for resistance to host lysozyme. Mutations in these two genes result in increased sensitivity of peptidoglycan to lysozyme inducing attenuation of *L. monocytogenes* virulence [133].

The *lplA1* gene encodes a lipoatligase that promotes cytosolic replication of *Listeria* in target cells [96].

The *gtcA* gene encodes an enzyme that catalyses glycosylation of teichoic acid in the envelope of *L. monocytogenes*, which mediates key features of pathogenicity: proper anchoring of the main surface virulence factors (Ami and InlB); resistance to antimicrobial peptides and reduced susceptibility to antibiotics [114].

The *prsA2* gene encodes a peptidylprolyl-cis-trans isomerase that promotes proper protein folding, which is essential for the maturation and secretion of some proprotein virulence factors (such as phospholipase C PC-PLC) of *L. monocytogenes*, and the *lplA1* gene is required for intracellular survival of *Listeria* [76].

The *clpC*, *clpE* and *clpP* genes encode proteases that presumably act as mediators of the stress response and promote intracellular replication [150].

Hypervirulent isolates of *L. monocytogenes*, in addition to the pathogenicity islet LIPI-1, also contain islets LIPI-3 and LIPI-4 [112]. Moreover, the LIPI-3 islet contains genes encoding listeriolysin S, a second haemolysin that enhances *L. monocytogenes* survival in polymorphonuclear neutrophils, whereas LIPI-4 encodes a cellobiose phosphotransferase system [61] that enhances invasion into the central nervous system, along with maternal-neonatal infection. In ad-

dition, the pathogenicity islet LIPI-3 contains genes encoding important virulence factors, namely internalins. These include the operon InLab, which promotes invasion of epithelial and other cells, and *inlC*, which is involved in intercellular spread [60]. Hypervirulent strains of *L. monocytogenes* containing LIPI-3, having a bactericidal function, have been found to promote intestinal colonisation and can modulate the host microbiota [132].

Along with genes encoding pathogenicity and virulence factors, the genome of *L. monocytogenes* is characterised by the presence of SSI-1 (lmo0444, lmo0445, pva, gadD1 and gadT1) [130] and SSI-2 (lin0464 and lin0465) stress tolerance islands [87]. It was found that SSI-1 predetermines bacterial resistance to acids, salts, and growth in food [130], whereas SSI-2 predetermines survival under alkaline conditions and oxidative stress [57, 87].

It has also been shown that the presence in the *L. monocytogenes* genome of the *lin* gene correlates with resistance to the macrolide clarithromycin, the *sul* gene — to the sulfonamide bisepitol, the *fosX* gene — to fosfomicin, the *aad*, *ant*, and *aph* genes — to amikacin, and alleles 1, 8, 15, 18, and 28 of the *pbp*-like gene — to beta-lactams [3].

An important specific feature of the genomes of the genus *Listeria*, probably also related to the ability of these bacteria to colonise a wide range of ecosystems, is the presence of a large number of genes encoding various transport proteins [50]. As in most bacterial genomes, the predominant class of transport proteins in *Listeria* is ABC-transporters. Moreover, 26% of the genes encoding *Listeria* transport proteins are responsible for carbohydrate transport mediated by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase (PTS) system, which allows bacteria to utilise different carbon sources. Furthermore, in many bacteria studied so far, PTS is a key link between metabolism and regulation of catabolic operons [146].

Thus, the genome of *L. monocytogenes* is characterised by the presence of a large variety of genes responsible for invasion into target cells of the host organism, survival in them, resistance to antibiotics and disinfectants, which determines the high pathogenicity and virulence of bacteria of this species.

Methods of identification of different *Listeria* species

The increasing role of *Listeria* in the structure of human infectious pathologies makes it necessary to improve the diagnosis, prevention, and sanitary and epidemiological surveillance of listeriosis, which predetermines the creation of new immunobiological preparations and modern schemes for the isolation and identification of *L. monocytogenes* in accordance with international standards [30]. In addition, it has been established that *L. monocytogenes* is characterised by variability in morphological, cultural and bio-

chemical properties, which causes difficulties in the laboratory diagnosis of listeriosis. In particular, it has been revealed that storage of food products at +22°C and seafood and dairy products at +6°C may change the pathogenic properties of *Listeria* and, in particular, the loss of haemolytic activity and decreased production of lecithinase, which is important for the differentiation of *L. monocytogenes* from other non-pathogenic *Listeria* species [41].

Currently, morphological, bacteriological, biochemical, serological and molecular biological methods are used to diagnose listeriosis.

Morphological diagnosis of listeriosis is based on the detection during autopsy of granulomas (listeriomas) in internal organs in the form of whitish, greyish or yellowish nodules ranging in size from a poppy seed to a millet grain, which are most often found in the liver, colon, pharynx, oesophagus, lungs, spleen and brain [26]. In the initial stages, listeriomas represent a small focus of inflammation, in the centre of which a large number of partially phagocytised *Listeria* are found among decaying leukocytes. Further the number of leukocytes in the focus increases, and in its peripheral parts an admixture of fibrin is found. At later stages of the process on the periphery of the focus there are small overgrowths of granulation tissue, consisting mainly of macrophages, which can gradually completely replace the area of necrosis. *Listeria* is practically undetectable in the granulation tissue [153].

The biochemical methods of *L. monocytogenes* differentiation are based on catalase positivity, motility at 18–25°C and immobility at 37°C, the ability to hydrolyse esculin and not to exhibit lecithinase activity, typical of *Listeria* parasitising inside the cell, when cultured on nutrient media containing lecithin [21].

The presence of the gene encoding lecithinase is typical not only for *L. monocytogenes*, but also for *L. seeligeri* and *L. ivanovii*, but not for *L. innocua* [82]. At the same time, *L. monocytogenes* is characterised by induction of lecithinase activity when activated charcoal is added to the nutrient medium, whereas *L. ivanovii* is characterised by lecithinase activity irrespective of the presence of activated charcoal in the incubation medium, and *L. seeligeri* is characterised by the absence of lecithinase activity irrespective of the presence of activated charcoal in the incubation medium [21], which is most likely due to interspecific differences in the regulation of the expression of pathogenicity factors. One of the reasons for the increased production of lecithinase and other pathogenicity factors in *L. monocytogenes* is the activation of the positive regulator of pathogenicity factor expression PrfA [137], which is highly homologous in *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, and *L. seeligeri*, but differs by 3 amino acid residues in these species, possibly affecting its functionality.

The increase in the production of pathogenicity factors (particularly lecithinase) by *L. monocytogenes* in the presence of activated charcoal is associated

with its adsorption and, consequently, the elimination of the autorepressor product produced by *Listeria* itself from the incubation medium [75]. In this connection, the restoration of *Listeria*'s ability to produce lecithinase upon addition of the sorbent to the incubation medium should not depend on the composition of the cultivation medium. At the same time, in the studies of some specialists a significant difference in the induction of lecithinase activity on different media, including media of the same name, produced by different manufacturers, was found, which may be due to the following reasons. Firstly, the components of the medium can influence the adsorption capacity of carbon, in particular, even trace amounts of detergents can reduce the adsorption properties of carbon. Secondly, the increase in lecithinase activity when a sorbent is added to *Listeria* incubation medium may be due not only to an increase in the amount of lecithinase produced, but also to an increase in its lecithinase activity depending on the influence of external factors, the concentration of which in the medium may vary.

Differentiation of species of the genus *Listeria* based on motility at certain temperatures is complicated by the fact that some strains of *L. innocua* showed motility at both 37°C and 20°C, while some strains of *L. welshimeri* remained immobile at room temperature [21].

Another biochemical feature of bacteria of the genus *Listeria* is the ability to hydrolyse 4 carbohydrates (manitol, rhamnose, raffinose and D-xylose), but this ability cannot be used to differentiate *L. monocytogenes* from *L. innocua* [21].

Other methods of bacteriological identification of *Listeria*, which allow differentiating pathogenic and non-pathogenic species, often give contradictory results. In particular, the β -haemolysis characteristic of *L. monocytogenes* on blood agar is weakly expressed in some strains, and some strains show no haemolytic activity at all [21].

To date, bacteriological confirmation of listeriosis is the only reliable way to make a final diagnosis [42], which necessitates the development of new approaches for isolating, typing, and identifying virulent strains of *Listeria* in order to identify the most significant of them in human infectious pathology.

At the same time, the duration of investigations by bacteriological methods varies from 3–4 days for negative results to 10–11 days to confirm a positive result. In addition, the detection of *L. monocytogenes* in animal products by microbiological methods is often difficult due to the high concentration of competitive microflora, the presence of *Listeria*-inhibiting food components and the generally low level of *L. monocytogenes* in samples [122]. Finally, the bacteriological characterisation of *Listeria* in clinical samples is sometimes difficult due to the variability of *Listeria* and its tendency to form coccoid forms [21], predisposing cases of false identification of *Philococcus*, *Corynebacterium* and *Enterococcus* as *L. monocytogenes* and vice ver-

sa. At the same time, the parallel use of biochemical methods, and, in particular, the typical for *L. monocytogenes* induction of lecithinase activity in the incubation medium in the presence of sorbents makes it possible to reliably identify *L. monocytogenes* from lecithinase-producing *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*, whereas the absence of lecithinase activity in the medium without sorbents distinguishes *L. monocytogenes* from staphylococci.

Although serological methods are adjunctive in the diagnosis of listeriosis, they are often effective and provide relatively rapid results, ease of reaction, and the ability to test a variety of biomaterial.

Serological reactions used for the diagnosis of listeriosis include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), agglutination reaction (RA), complement binding reaction (CBR), indirect haemagglutination reaction (IHGR), and indirect immunofluorescence reaction (NIRF). Blood and cerebrospinal fluid can be used as test material, and the result is considered positive when the antibody titre is from 1:250 to 1:5000 [32].

In the laboratory diagnosis of listeriosis, two serological methods are most often used: complement binding reaction with inactivated cytoplasmic antigen and indirect haemagglutination reaction with erythrocyte antigenic diagnosticum [2], which are not highly specific. In general, serological diagnosis of listeriosis is not sufficiently effective due to false-positive results, the diverse antigenic structure of the bacterium, the antigenic affinity of *Listeria* with other microorganism species, and the technical conditions of the reactions [34].

Most serological methods for the detection of *Listeria* are based on the use of monoclonal antibodies, which was the first method for typing *L. monocytogenes* serotypes [72]. However, this method is time-consuming and has a low differential capacity [98]. Therefore, molecular typing methods have become increasingly popular for *Listeria* typing [72], including ribotyping, multi-target enzyme electrophoresis (MLEE), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and multi-target sequencing (MLST) [90]. Meanwhile, PFGE is considered the gold standard method for determining *Listeria* subtypes because of its differential ability, reproducibility and repeatability [109].

The first monoclonal antibodies for the detection of *Listeria* showed specificity to a common flagellar H-antigen typical for *L. monocytogenes*, *L. ivanovi*, *L. innocua*, *L. weishimeri* and *L. seeligeri*, but not for 30 cultures of other species, including staphylococci and streptococci [80]. Subsequently, a genus-specific panel of monoclonal antibodies developed by B.T. Butman et al. [53], including 15 specific antibodies showing affinity to thermostable rhodospesific protein with molecular mass from 30 000 to 38 000 Da and not cross-reacting with 21 species of other microorganisms, including streptococci. Two monoclonals from this panel were subsequently used to create a commercial immunoenzyme test

system (*Listeria* — ЕЕК) for the detection of *Listeria* spp. [62], which has found widespread use as an additional, but not alternative, method for the detection of *Listeria* spp. in food [138].

At the same time, polyclonal antibodies used in the immunofluorescence method and monoclonal antibodies are currently not practically used for the diagnosis of listeriosis and retain practical significance only in livestock facilities for the prevention of listeriosis in animals and service personnel [39].

Currently, serological methods used in clinical laboratory diagnostics and aimed at detecting specific antibodies to *Listeria* have been developed. One of the relatively specific serological methods is the detection of antibodies to listeriolysin O, the terminal polypeptide fragment of the recombinant molecule of which is the most specific when screening sera of listeriosis patients compared to other protein antigens [84]. At the same time, experts recommend using this serological method only to detect non-invasive asymptomatic forms of the disease in epidemic outbreaks of listeriosis [53]. When analysing the sera of donors and patients with listeriosis, it is advisable to detect antibodies to the protein antigens of *Listeria* (*irpA*, *InlB* and *actA*) associated with pathogenicity [24, 84]. Specific antibodies to *Listeria* antigens are detected in the blood from the second week of the disease and persist for several years after recovery.

At the same time, it is known that *Listeria* serovars and serotypes are not species-specific and may be common to different *Listeria* species regardless of their pathogenicity for humans. In particular, *L. monocytogenes* is characterised by one or more common antigenic determinants with *Listeria* species other than *L. welshimeri*. In this regard, serovar identification alone, without the use of other methods, does not accurately identify listeriosis [50].

Thus, serological methods for diagnosing listeriosis have a number of disadvantages, including low specificity (*Listeria* antigens are very similar in structure to antigens of other microorganisms, so false-positive or false-negative results are often obtained), the possibility of detecting not the pathogen itself, but only antibodies to it, low reliability of the results, false-negative reactions in severe immunodeficiency states even in very severe course of listeriosis, and the possibility of performing the analysis of *Listeria* antigens. In general, the results of serological tests provide certain information about a patient's possible contact with the pathogen, but do not allow diagnosing listeriosis with a high degree of accuracy even when several serological methods are used, including due to the antigenic affinity of *Listeria* with staphylococci, enterococci and erysipeloid [20].

The diagnosis of listeriosis can be suspected or made if there is a reliable difference in antibody titres in paired sera of patients with a characteristic clinical picture (RA with coloured diagnostics, RBC, NIRF, RNAS), cerebrospinal fluid (NIRF, PCR, ELISA, microscopy)

and bacteriological examination by enrichment with charcoal immunoglobulin sorbent [13, 39, 42].

At the same time, serological methods of laboratory diagnostics of listeriosis remain the main methods in the practice of Russian bacteriologists and allow establishing the presumed diagnosis with further confirmation by bacteriological methods [40]. However, the slide agglutination method is relatively simple and reliable, requiring the availability of agglutinating listeriosis sera, the improvement of methods for obtaining which is very important at present.

One of the relatively fast, highly effective methods for the detection of *L. monocytogenes* is the molecular biological method of PCR and enzyme immunoassay [27] using the highly specific chromogenic medium ALOA-agar [48].

The specificity and high sensitivity of PCR have been confirmed on various strains of pathogenic *Listeria*, but poor lysis of some *Listeria* strains, apparently related to the structure of the cell wall, may give false-negative results [21]. In this regard, some specialists recommend PCR using *Listeria* cells added to the reaction mixture without pretreatment with lytic enzymes [67]. In addition, the multi-targeted variable number of tandem repeats assay (MLVA), a PCR-based typing method that characterises bacteria by detecting tandem repeats at several specific loci in the bacterial genome, is quite informative [79, 108].

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight (MALDI-ToF) is a relatively effective method for the identification of *L. monocytogenes* [12]. At the same time, there are reports in the literature that species identification of *Listeria* species by MALDI-ToF is not always correct, which may be due to the influence of various factors, such as cultivation conditions, the composition of nutrient media, and the level of polymorphism of strains taken for research [89, 125].

Real-time polymerase chain reaction is a comparatively fast and practical alternative to the microbiological method for the detection of *Listeria* [35]. Therefore, the development of species-specific PCR methods for the detection of the *L. monocytogenes* genome is an urgent task. For PCR identification of *L. monocytogenes*, various genes are used as targets: 16S and 23S rRNA, *prs*, *gyrB*, *rpoB*, *hly*, *inlA* and *inlB*, *plcA*, *iap*, etc. [17, 21, 69, 113, 121, 147]. At the same time, the real-time PCR method does not allow distinguishing viable bacterial cells from non-viable ones; therefore, positive results obtained using this method must necessarily be confirmed by a traditional microbiological method [35].

To determine the serological affiliation of *Listeria* cultures, according to the world classification, it is recommended to use the multiplex PCR method based on the correlation between the serogroup affiliation of an isolate and the presence of specific open reading frames in its genome [9, 16], which makes it possible to identify the diversity of *L. mono-*

cytogenes cultures and differentiate the strains of epidemic significance and danger to humans [39].

To obtain *Listeria* isolation media, it is necessary to study the optimal conditions for their growth and reproduction and to determine the optimal concentrations of nutrient elements. *Listeria* have been found to grow on simple nutrient media, capable of reproduction in a wide range of temperatures (4–45°C), pH (5.0–9.0), and humidity, in the presence of 20% NaCl and 15% CO₂ [29, 49]. The high metabolic plasticity of *Listeria* determines the possibility of their transition from the saprophytic phase to the parasitic phase and vice versa; optimal cultivation conditions are necessary to preserve the virulent properties of *Listeria*, which is important for the accumulation of full biomass [29]. At the same time, the cultivation conditions (composition of nutrient media, temperature and incubation time) influence the polymorphism of *Listeria*, which complicates the estimation of the results of bacteriological analysis and may lead to errors in diagnosis [5]. In particular, the prolonged stay of *Listeria* in cold storage predetermines the presence of most of the microorganisms at the L-transformation stage, which requires a long time of their reversion in enrichment media for the detection of pathogens [5]. In this regard, accurate diagnosis of *Listeria* requires the use of methods such as DNA diagnosis, PCR and ELISA [5].

At the same time, accelerated methods such as ELISA, PCR, DNA-DNA and DNA-RNA hybridisation, radioimmunological methods, and the use of chromogenic nutrient media are the most suitable for the detection of *L. monocytogenes* in perishable products, which are characterised by high speed of analysis, sensitivity and specificity, and low consumption of nutrient media. High sensitivity and specificity in detecting *L. monocytogenes* has been shown for the test system LOCATE® *Listeria*, in which highly specific monoclonal antibodies to thermostable O-antigens or somatic antigens of the *Listeria* cell wall are used as antibodies [6]. Proteomics methods involving mass spectrometric analysis of proteins are also used to diagnose listeriosis [31].

References

1. Антошина И.Ф., Мезенцева М.В. *Listeria monocytogenes*: распространение и механизмы иммунного ответа // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 627–634. [Antoshina I.F., Mezentseva M.V. *Listeria monocytogenes*: spreading and mechanisms of immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 627–634. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-627-634
2. Арзымбетова Ж.Х., Ахметова А.Т., Нургалиева К.Ж. Лабораторная диагностика листериоза // Медицинский журнал Западного Казахстана. 2011. Т. 30, № 2. С. 12–15. [Arzymbetova Zh.H., Ahmetova A.T., Nurgaliyeva K.Zh. Laboratory diagnostic of listeriosis. *Medsinskiy zhurnal Zapadnogo Kazakhstana = Medical Journal of Western Kazakhstan*, 2011, vol. 30, no. 2, pp. 12–15. (In Russ.)]
3. Асташкин Е.И., Алексеева Е.А., Борзенков В.Н., Кисличкина А.А., Мухина Т.Н., Платонов М.Е., Светоч Э.А., Шепелин А.П., Фурсова Н.К. Молекулярно-генетическая характеристика полирезистентных штаммов *Listeria monocytogenes* и идентификация новых сиквенса-типов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2021. Т. 39, № 5. С. 3–13. [Astashkin E.I., Alekseeva E.A., Borzenkov V.N., Kislichkina A.A., Mukhina T.N., Platonov M.E., Svetoch E.A., Shepelin A.P., Fursova N.K. Molecular genetic characteristics of polyresistant *Listeria monocytogenes* strains and identification of new sequence types. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2021, vol. 39, no. 4, pp. 3–13. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen2021390413

Conclusion

Throughout their long evolution, pathogenic *Listeria* have developed a set of unique mechanisms that allow them, along with a saprophytic lifestyle, to switch to intracellular parasitisation, avoiding contact with the humoral immune system and suppressing at the initial stages of infection the Th1-type immune response, which is essential for the elimination of intracellular parasites. In addition, *L. monocytogenes* is able to switch on phagocytosis in those cells for which it is not usually characteristic, which predetermines the possibility of its invasion of a wide range of target cells and significantly complicates the course of listeriosis.

Ecological plasticity and tolerance of *Listeria* determine their ability to change from saprophytic to parasitic way of life and to reverse back to saprophyticism when they enter the environment and survive under different environmental conditions. At the same time, non-pathogenic *Listeria*, as well as pathogenic microorganisms forming a biocenosis with *L. monocytogenes*, can serve as a reservoir of pathogenicity and resistance determinants and be transmitted to pathogenic *Listeria* by horizontal transfer. Thus, the high degree of genetic relatedness of *L. monocytogenes* with *L. innocua* makes it possible for *L. innocua* to create reservoirs of resistance genes that can be transferred to *L. monocytogenes*, including virulence genes. In addition, pathogenicity genes can be transferred from *L. monocytogenes* to *L. innocua*, which predetermines the emergence of atypical haemolytic pathogenic strains, which, given the greater prevalence of *L. innocua* in the environment, may pose a greater threat to humans and animals.

The constant evolution of pathogenic *Listeria* and their acquisition of new surface antigens, in turn, complicate the laboratory diagnosis of listeriosis and differential typing of *Listeria* in the food industry and require the development of new immunobiological preparations, culture media and modern schemes for the isolation and identification of *L. monocytogenes*.

4. Балясова Н.А., Алимов А.М. Стабильность штаммов листерий // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2017. Т. 230, № 2. С. 24–26. [Balyasova N.A., Alimov A.M. Stability of listeria strains. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Bauman* = *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine*. N.E. Bauman, 2017, vol. 230, no. 2, pp. 24–26. (In Russ.)]
5. Банникова Д.А., Павлова И.Б., Кононенко А.Б., Болотский М.Н., Бритова С.В. Морфология популяций листерий при различных условиях культивирования (сканирующая электронная микроскопия). I сообщение // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2009. Т. 2, № 2. С. 1–7. [Bannikova D.A., Pavlova I.B., Kononenko A.B., Bolotsky M.N., Britova S.V. Morphology of listeria popylation under thr different conditions of cultivation (scanning electron microscooy). *Rossiyskiy zhurnal "Problemy veterinarnoy sanitarii, gigyeny i ekologii"* = *Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*, 2009, vol. 2, no. 2, pp. 1–7. (In Russ.)]
6. Болотский М.Н. Индикация *Listeria monocytogenes* в продовольственном сырье и продуктах животного происхождения методом ИФА // Ветеринарная патология. 2007. № 2. С. 46–49. [Bolotsky M.N. Indication of *Listeria monocytogenes* in food raw materials and products of animal origin by EIA. *Veterinarnaya patologiya* = *Veterinary Pathology*, 2007, no. 2, pp. 46–49. (In Russ.)]
7. Бузолева Л.С., Терехова В.Е. Выживаемость и адаптивная изменчивость штаммов *Listeria monocytogenes* в морской и речной воде // Ветеринарная патология. 2004. № 5 (11). С. 31–35. [Buzoleva L.S., Terekhova V.E. Survival and adaptive variability of *Listeria monocytogenes* strains in sea and river water. *Veterinarnaya patologiya* = *Veterinary Pathology*, 2004, no. 4 (11), pp. 31–35. (In Russ.)]
8. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Ковалева Е.Н. Разработка системы молекулярно-генетической детекции бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* // Вестник Уральской государственной сельскохозяйственной академии. 2014. № 1 (25). С. 43–46. [Vasilyev D.Ar., Mastilenko A.V., Kovaleva E.N. Development of a system of molecular genetic detection of bacteria types of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Vestnik Ural'skoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Bulletin of the Ural State Agricultural Academy*, 2014, no. 1 (25), pp. 43–46. (In Russ.)]
9. Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Мастиленко А.В. Идентификация бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* методом мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» // Биотика. 2014. Т. 1, № 1. С. 3–6. [Vasiliev D.A., Kovaleva E.N., Mastilenko A.V. Identification of bacteria species *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* by multiplex real-time PCR. *Biotika* = *Biotika*, 2014, vol. 1, no. 1, pp. 3–6. (In Russ.)]
10. Гальцева Г.В., Федоренко Л.М., Инжеватова В.Б., Буланова Е.Е. Лабораторная диагностика листериоза // Успехи современного естествознания. 2006. № 1. С. 52–53. [Galtseva G.V., Fedorenko L.M., Ingevatova V.B., Bulanova E.E. Laboratory diagnostics of listeriosis. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya* = *Success in Modern Natural Science*, 2006, no. 1, pp. 52–53. (In Russ.)]
11. Громыко Н.Л., Захаренкова Т.Н., Желобкова Т.И., Недосейкина М.С., Кустова М.А. Акушерские аспекты листериоза // Проблемы здоровья и экологии. 2013. № 3 (37). С. 132–136. [Gromyko N.L., Zakharenkova T.N., Zhelobkova T.I., Nedoseikina M.S., Kustova M.A. Obstetrical aspects of listeriosis. *Problemy zdorov'ya i ekologii* = *Problems of Health and Ecology*, 2013, no. 3 (37), pp. 132–136. (In Russ.)]
12. Дегушев К.В., Богун А.Г., Мухина Т.Н., Соломенцев В.И. Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования // Бактериология. 2018. Т. 3, № 3. С. 28–33. [Detushev K.V., Bogun A.G., Mukhina T.N., Solomentsev V.I. Comparing methods of direct application of biomass and protein extracts in identification of microorganisms of the genus of listeria by MALDI-ToF typing method. *Bakteriologiya* = *Bacteriology*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 28–33. (In Russ.)]
13. Егорова И.Ю., Цыбанова В.А. Дикие животные как источник пищевых токсикоинфекций человека // Ветеринарная патология. 2014. № 5. С. 45–49. [Egorova I.Yu., Tsybanova V.A. Wild animals as a source of human food poisoning. *Veterinarnaya patologiya* = *Veterinary Pathology*, 2014, no. 4, pp. 45–49. (In Russ.)]
14. Ермолаева С.А., Тартаковский И.С. Регуляция экспрессии факторов вирулентности у *Listeria monocytogenes* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2001. № 3. С. 106–110. [Ermolaeva S.A., Tartakovskii I.S. Virulence factor expression regulation in *Listeria monocytogenes*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2001, no. 3, pp. 106–110. (In Russ.)]
15. Зайцева Е.А. Особенности биологических свойств бактерии вида *Listeria innocua*, выделенных на территории Приморского края // Альманах клинической медицины. 2017. Т. 45, № 2. С. 147–153. [Zaitseva E.A. Specific biological properties of *Listeria innocua* spp. isolated in Primorye Territory. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny* = *Almanac of Clinical Medicine*, 2017, vol. 45, no. 2, pp. 147–153. (In Russ.)]
16. Зайцева Е.А., Ермолаева С.А. Дифференциация штаммов *Listeria monocytogenes* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 40–42. [Zaytseva E.A., Yermolaeva S.A. Differentiation of listeria monocytogenes strains by the method of multiplex polymerase chain reaction. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Pacific Medical Journal*, 2014, no. 3, pp. 40–42. (In Russ.)]
17. Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И., Сомов Г.П. Распространение *Listeria monocytogenes* и ее роль в инфекционной патологии на Дальнем Востоке России // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 5. С. 19–23. [Zaitseva E.A., Ermolaeva S.A., Pukhovskaya N.M., Musatov Yu.S., Ivanov L.I., Somov G.P. Spreading *Listeria monocytogenes* and its role in infectious pathology in the russian far east. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Pacific Medical Journal*, 2010, no. 4, pp. 19–23. (In Russ.)]
18. Зайцева Е.А., Федянина Л.Н. О неспецифической профилактике листериоза // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 5. С. 5–7. [Zaitseva E.A., Fedyanina L.N. On non-specific prevention of listeriosis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Pacific Medical Journal*, 2010, no. 4, pp. 5–7. (In Russ.)]
19. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Микробиологическая характеристика *Listeria monocytogenes*, изолированных из различных источников в Приморском крае // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 2. С. 3–6. [Zaitseva E.A., Somov G.P. Microbiological characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from different sources in the primorsky territory. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2006, no. 2, pp. 3–6. (In Russ.)]

20. Идиатулин Р.И. Диагностический мониторинг листериоза // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2010. № 5. С. 23–26. [Idiatulin R.I. Diagnostic monitoring of listeriosis. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii* = *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*, 2010, no. 4, pp. 23–26. (In Russ.)]
21. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Лопырев И.В. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. Т. 3, № 3. С. 266–227. [Karpova T.I., Ermolaeva S.A., Lopirev I.V., Brodinova N.S., Tartakovski I.S., Vazquez-Boland J.A. New Methods for Identification of *Listeria monocytogenes*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, vol. 3, no. 3, pp. 266–227. (In Russ.)]
22. Куликовский А.В., Хапцев З.Ю., Макаров Д.А., Комаров А.А. Пищевая микробиология: эмерджентные зоонозы. М.: Издательство Юрайт, 2019. 233 с. [Kulikovskiy A.V., Khaptsev Z.Yu., Makarov D.A., Komarov A.A. Food microbiology: emerging zoonoses. *Moscow: Yurayt Publishing House*, 2019. 233 p. (In Russ.)]
23. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. М.: БИНОМ, 2012. 1152 с. [Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., Ivanova S.M. Guide to medical microbiology. Private medical microbiology and etiological diagnosis of infections. *Moscow: BINOM*, 2012. 1152 p. (In Russ.)]
24. Мукантаев К.Н., Бегалиева А., Инірбай Б., Райымбек Г., Казыкен Д., Сегізбаева Г.Ж. Получение рекомбинантного антигена р60 *Listeria monocytogenes* // Биотехнология. Теория и практика. 2015. № 1. С. 17–25. [Mukantayev K.N., Shustov A.B., Sydyknabi I., Bigalyeva A., Raiymbek G., Mukanov K.K. Obtaining of recombinant protein fragment of the GP51 antigen virus of bovine leukemia expressed in *E.coli* without insert thioredoxin. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika* = *Biotechnology. Theory and Practice*, 2015, no. 1, pp. 17–25. (In Russ.)] doi: 10.11134/btp.1.2015.2
25. Мухина Л.Б., Дмитриева Е.Ю. Организация контроля за распространением возбудителя листериоза *Listeria monocytogenes* на рыбоперерабатывающих предприятиях. СПб.: Моринтех, 2003. 32 с. [Mukhina L.B., Dmitrieva E.Yu. Organization of control over the spread of the causative agent of listeriosis *Listeria monocytogenes* at fish processing plants. *St. Petersburg: Morintex*, 2003. 32 p. (In Russ.)]
26. Нафеев А.А., Сидорова Н.Н., Лебедько А.М., Никонов О.А., Минаев М.Ю., Сайфутдинова Ф.Ф., Попов В.В., Модникова В.И. Случай септико-тифозной формы листериоза // Клиническая медицина. 2013. № 2. С. 58–59. [Nafeev A.A., Sidorova N.N., Lebed'ko A.M., Nikonov O.A., Minaev M.Yu., Saifutdinova F.F., Popov V.V., Mednikova V.I. Clinical manifestations of listeriosis sepsis. *Klinicheskaya meditsina* = *Clinical Medicine*, 2013, no. 2, pp. 58–59. (In Russ.)]
27. Нечаев А.Ю. Сравнительный анализ результатов выявления *Listeria monocytogenes* в мясе и мясопродуктах // Международный вестник ветеринарии. 2009. № 3. С. 13–17. [Nechaev A.Y. Comparative analysis of results for the determination of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii* = *International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2009, no. 3, pp. 13–17. (In Russ.)]
28. Олешенко Е.П., Алферова Е.В. Листерии как возбудители пищевых инфекций // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2012. № 3–4. С. 211–212. [Oleshchenko E.P., Alferova E.V. Lister as causative agents of food borne infections. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka* = *Health. Medical Ecology. The Science*, 2012, no. 3–4, pp. 211–212. (In Russ.)]
29. Омарова С.М., Исаева Р.И. Биологические свойства штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных на новых отечественных селективных питательных средах из клинического материала при диагностике листериоза беременных и новорожденных // Астраханский медицинский журнал. 2011. Т. 6, № 1. С. 147–151. [Omarova S.M., Isaeva R.I. The biological properties of *Listeria monocytogenes* strains received on the base of new home-produced selective nutritive media from the clinical material in listeria diagnostics of pregnant women and new-borns. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Astrakhan Medical Journal*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. 147–151. (In Russ.)]
30. Омарова С.М., Ахмедова Э.М., Муртазалиева П.М. Питательные среды для изучения биологических свойств листерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2007. № 3. С. 95–97. [Akhmedova E.M., Omarova S.M., Murtuaieva P.M., Nurmagomedova Z.M. Nutnent media for study of biologic characteristics of listeria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2007, no. 3, pp. 95–97. (In Russ.)]
31. Пискунов А.В., Прунтова О.В., Шадрова Н.Б., Ручнова О.И. Использование MALDI-ToF масс-спектрометрии для идентификации бактерий рода *Listeria* // Труды федерального центра охраны здоровья животных. 2011. Т. 9, № 1. С. 242–249. [Piskunov A.V., Pruntova O.V., Shadrova N.B., Ruchnova O.I. Application of MALDI-ToF mass-spectrometry for identification of *Listeria* species. *Trudy federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zivotnykh* = *Works of the Federal Center for Animal Health*, 2011, vol. 9, no. 1, pp. 242–249. (In Russ.)]
32. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 816 с. [Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. Infectious diseases and epidemiology: a textbook. *Moscow: GEOTAR-Media*, 2009. 816 p. (In Russ.)]
33. Поманская Л.А. О размножении листерий в почве // Микробиология, эпидемиология, иммунология. 1963. № 6. С. 99–101. [Pomanskaya L.A. On the reproduction of listeria in the soil. *Mikrobiologiya, epidemiologiya, immunobiologiya* = *Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*, 1963, no. 6, pp. 99–101. (In Russ.)]
34. Садова Н.В., Заплатников А.Л. Врожденный листериоз // Русский медицинский журнал. 2008. № 18. С. 162–165. [Sadova N.V., Zaplatnikov A.L. Congenital listeriosis. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* = *Russian Medical Journal*, 2008, no. 18, pp. 162–165. (In Russ.)]
35. Скитович Г.С., Шадрова Н.Б., Прунтова О.В., Серова К.В. Оптимизация ПЦР в реальном времени для выявления генома *Listeria monocytogenes* // Ветеринария сегодня. 2018. Т. 26, № 3. С. 63–68. [Skitovich G.S., Shadrova N.B., Pruntova O.V., Serova K.V. Real-time PCR optimization for *Listeria monocytogenes* genome detection. *Veterinariya segodnya* = *Veterinary Today*, 2018, vol. 26, no. 3, pp. 63–68. (In Russ.)]
36. Сидоренко М.Л. Влияние летучих метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* на размножение патогенных бактерий // Тихоокеанский медицинский журнал. 2001. № 7. С. 131. [Sidorenko M.L., Buzoleva L.S. Influence of volatile metabolites of bacteria of the genus *Pseudomonas* on the reproduction of pathogenic bacteria. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Pacific Medical Journal*, 2001, no. 7, p. 131. (In Russ.)]

37. Сомов Г.П. Особенности экологии внеорганизменных популяций патогенных бактерий и их отражение в эпидемиологии инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997. № 5. С. 12–15. [Somov G.P. Features of the ecology of extraorganismal populations of pathogenic bacteria and their reflection in the epidemiology of infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1997, no. 5, pp. 12–15. (In Russ.)]
38. Стародумова С.М., Зайцева Е.А. Способ быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *Listeria monocytogenes* с помощью мультиплексной ПЦР // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 1. С. 95–97. [Starodumova S.M., Zaitseva E.A. The way of a quick identification of bacteria genus *Listeria* and pathogenic species of *Listeria monocytogenes* by means of the multiplex polymerase chain reaction. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2014, no. 1, pp. 95–97. (In Russ.)]
39. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 2. С. 20–30. [Tartakovski I.S. *Listeriae*: the role in infection diseases and laboratory diagnostics. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, vol. 2, no. 2, pp. 20–30. (In Russ.)]
40. Хаптанова Н.М., Андреевская Н.М., Лукьянова С.В., Коновалова Ж.А., Гефан Н.Г., Остяк А.С., Токмакова Е.Г. Особенности серологической диагностики листериоза (обзор литературы) // Acta Biomedica Scientifica. 2019. Т. 4, № 1. С. 43–49. [Khaptanova N.M., Andreevskaya N.M., Lukyanova S.V., Konovalova Zh.A., Gefan N.G., Ostyak A.S., Tokmakova E.G. Aspects of serological diagnostics of listeriosis (literature review). *Acta Biomedica Scientifica*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 43–49. (In Russ.)] doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.7
41. Цветкова Н.Б. Изменчивость биологических свойств *Listeria monocytogenes* под влиянием абиотических факторов // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2012. Т. 1–2, № 57–48. С. 253–257. [Tsvetkova N.B. The variability of the biological properties of *Listeria monocytogenes* under the influence of abiotic factors. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka = Health. Medical Ecology. The Science*, 2012, vol. 1–2, no. 47–48, pp. 253–257. (In Russ.)]
42. Юшук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Инфекционные болезни: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 1061 p. [Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. Infectious diseases: national guidelines. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 1061 p. (In Russ.)] doi: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104
43. Andre P., Genicot A. First isolation of *Listeria welshimeri* in a human. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg A.*, 1987, vol. 263, no. 4, pp. 605–606
44. Baquero F., Lanza V., Duval M., Coque T.M. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, 2020, vol. 113, no. 3, pp. 570–579. doi: 10.1111/mmi.14454
45. Becker B., Schuler S. Schnellnachweis von *Listeria monocytogenes* in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 2007, vol. 87, no. 7, pp. 103–106.
46. Berlec A., Janež N., Sterniša M., Klančnik A., Sabotič J. *Listeria innocua* biofilm assay using nanoluciferase. *Bio Protoc.*, 2022, vol. 12, no. 3: e4308. doi: 10.21769/BioProtoc.4308
47. Bertsch D., Rau J., Eugster M.R., Haug M.C., Lawson P.A., Lacroix C., Meile L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, vol. 63, pp. 526–532. doi: 10.1099/ij.s.0.036947-0
48. Beumer R., Hazeleger W.C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 35, pp. 191–197. doi: 10.1016/s0928-8244(02)00444-3
49. Bhunia A.K. Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2008, vol. 23, pp. 77–107. doi: 10.3109/10408419709115131
50. Buchrieser C., Rusniok C., Kunst F., Cossart P., Glaser P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 35, no. 3, pp. 207–213. doi: 10.1016/S0928-8244(02)00448-0
51. Burkholder K.M., Bhunia A.K. *Listeria monocytogenes* uses *Listeria* Adhesion Protein (LAP) to promote bacterial transepithelial translocation and induces expression of LAP Receptor Hsp60. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, pp. 5062–5073. doi: 10.1128/IAI.00516-10
52. Burkholder K.M., Kim K.-P., Mishra K.K., Medina S., Hahm B.-K., Kim H., Bhunia A.K. Expression of LAP, a SecA2-dependent secretory protein, is induced under anaerobic environment. *Microbes Infect.*, 2009, vol. 11, pp. 859–867. doi: 10.1016/j.micinf.2009.05.006
53. Butman B.T., Plank M.C., Durham R.J., Mattingly J.A. Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, vol. 54, no. 6, pp. 1564–1569. doi: 10.1128/aem.54.6.1564-1569.1988
54. Carrero J.A., Calderon B., Unanue E.R. Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, pp. 933–940. doi: 10.1084/jem.20060045
55. Chen J., Chen Q., Jiang L., Cheng C., Bai F., Wang J., Mo F., Fang W. Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 97–123. doi: 10.1186/1471-2180-10-97
56. Chen M., Cheng J., Wu Q., Zhang J., Chen Y., Zeng H., Ding Y. Prevalence, potential virulence, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from edible mushrooms in Chinese markets. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, pp. 1711–1722. doi: 10.3389/fmicb.2018.01711
57. Chen Y., Chen Y., Pouillot R., Dennis S., Xian Z., Luchansky J.B., Porto-Fett A.C.S., Lindsay J.A., Hammack T.S., Allard M., Van Doren J.M., Brown E.W. Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010–2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 4: e0231393. doi: 10.1371/journal.pone.0231393
58. Chiara M., Caruso M., D'Erchia A.M., Manzari C., Fracalvieri R., Goffredo E., Latorre L., Miccolupo A., Padalino I., Santagada G., Chiocco D., Pesole G., Horner D.S., Parisi A. Comparative genomics of *Listeria sensu lato*: genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity related traits through lateral gene transfer. *Genome Biol. Evol.*, 2015, vol. 7, no. 8, pp. 2154–2172. doi: 10.1093/gbe/evv131
59. Clayton E.M., Daly K.M., Guinane C.M., Hill C., Cotter P.D., Ross P.R. Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3. *BMC Microbiol.*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 58–67. doi: 10.1186/1471-2180-14-58

60. Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 49, pp. 19484–19491. doi: 10.1073/pnas.1112371108
61. Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., Daly K.M., Groeger D.S., Casey P.G., Ross R.P., Hill C. Listeriolysin S., a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.*, 2008, vol. 4: e1000144. doi: 10.1371/journal.ppat.1000144
62. Curiale M.S., Lepper W., Robison B. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products, seafoods, and meats: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 1994, vol. 77, no. 6, pp. 1472–1489. doi: 10.1093/jaoac/77.6.1472
63. Czuprynski C.J., Brown J.F., Wagner R.D., Steinberg H. Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, pp. 5161–5163. doi: 10.1128/iai.62.11.5161-5163.1994
64. Den Bakker H.C., Warchocki S., Wright E.M., Allred A.F., Ahlstrom C., Manuel C.S., Stasiewicz M.J., Burrell A., Roof S., Strawn L.K., Fortes E., Nightingale K.K., Kephart D., Wiedmann M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, vol. 64, no. Pt. 6, pp. 1882–1889. doi: 10.1099/ijs.0.052720-0
65. Den Bakker H.C., Manuel C.S., Fortes E.D., Wiedmann M., Nightingale K.K. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *Coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, vol. 63, pt 9, pp. 3257–3268. doi: 10.1099/ijs.0.048587-0
66. Den Bakker H.C., Cummings C.A., Ferreira V., Vatta P., Orsi R.H., Degoricija L., Barker M., Petrauskene O., Furtado M.R., Wiedmann M. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, 2010, vol. 11, no. 1, pp. 688–708. doi: 10.1186/1471-2164-11-688
67. Destro M.T., Leitao M.F., Farber J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1996, vol. 62, no. 2, pp. 705–711. doi: 10.1128/aem.62.2.705-711.1996
68. Doijad S.P., Poharkar K.V., Kale S.B., Kerkar S., Kalorey D.R., Kurkure N.V., Rawool D.B., Malik S.V.S., Ahmad R.Y., Hudel M., Chaudhari S.P., Abt B., Overmann J., Weigel M., Hain T., Barbuddhe S.B., Chakraborty T. *Listeria goaensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, no. 10, pp. 3285–3291. doi: 10.1099/ijs.0.002980
69. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 8, pp. 3819–3822. doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
70. Drolia R., Bhunia A.K. Crossing the intestinal barrier via *Listeria* adhesion protein and internalin A. *Trends Microbiol.*, 2019, vol. 27, no. 5, pp. 408–425. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.007
71. Drolia R., Tenguria S., Durkes A.C., Turner J.R., Bhunia A.K. *Listeria* adhesion protein induces intestinal epithelial barrier dysfunction for bacterial translocation. *Cell. Host. Microbe*, 2018, vol. 23, no. 4, pp. 470–484. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.004
72. Du X.-J., Zhang X., Wang X.-Y., Su Y.-L., Li P., Wang S. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. *Food Control*, 2016, vol. 74, pp. 9–16. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.11.024
73. El-Shenawy M., Manes J., Soriano J.M. *Listeria* spp. in Street-Vended Ready-to-Eat Foods. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2011, vol. 2011, pp. 1–6. doi: 10.1155/2011/968031
74. El-Shenawy M.A. *Listeria* spp. in the coastal environment of the Aqaba Gulf, Suez Gulf and the Red Sea. *Epidemiol. Infect.*, 2006, vol. 134, no. 4, pp. 752–757. doi: 10.1017/S0950268805005601
75. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovskii I.S. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, vol. 174, no. 1, pp. 137–141. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13560.x
76. Forster B.M., Zemansky J., Portnoy D.A., Marquis H. Posttranslocation chaperone PrsA2 regulates the maturation and secretion of *Listeria monocytogenes* proprotein virulence factors. *J. Bacteriol.*, 2011, vol. 193, pp. 5961–5970. doi: 10.1128/JB.05307-11
77. Freitag N.E., Port G.C., Miner M.D. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, vol. 7, no. 9, pp. 623–628. doi: 10.1038/nrmicro2171
78. Gaballa A., Guariglia-Oropeza V., Wiedmann M., Boor K.J. Cross Talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* Facilitates Transitions between Extra- and Intracellular Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2019, vol. 83, no. 4: e00034-19. doi: 10.1128/MMBR.00034-19
79. Gana J., Gcebe N., Pierneef R., Moerane R., Adesiyun A.A. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Genotypes of *Listeria monocytogenes* Isolated from Farms, Abattoirs, and Retail in Gauteng Province, South Africa. *J. Food Prot.*, 2022, vol. 85, no. 9, pp. 1249–1257. doi: 10.4315/jfp-22-081
80. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 29, no. 5, pp. 851–875. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.002
81. Gómez D., Azón E., Marco N., Carramiñana J.J., Rota C., Ariño A., Yangüela J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.*, 2014, vol. 42, pp. 61–65. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.017
82. Gouin E., Mengaud J., Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, no. 8, pp. 3550–3553. doi: 10.1128/iai.62.8.3550-3553.1994
83. Graves L.M., Helsel L.O., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Roof S.E., Orsi R.H., Fortes E.D., Milillo S.R., Den Bakker H.C., Wiedmann M., Swaminathan B., Saunders B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, vol. 60, no. 6, pp. 1280–1288. doi: 10.1099/ijs.0.014118-0
84. Grenningloh R., Darji A., Wehland J., Chakaraborty T., Weiss S. Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, no. 9, pp. 3976–3980. doi: 10.1128/iai.65.9.3976-3980.1997
85. Gudmundsdottir S., Gudbjornsdottir B., Lauzon H.L., Einarsson H., Kristinsson K.G. *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, vol. 101, no. 1, pp. 41–51. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.023
86. Hain T., Steinweg C., Kuenne C.T., Billion A., Ghai R., Chatterjee S.S., Domann E., Kärst U., Goesmann A., Bekel T., Bartels D., Kaiser O., Meyer F., Pühler A., Weisshaar B., Wehland J., Liang C., Dandekar T., Lampidis R., Kreft J., Goebel W.,

- Chakraborty T. Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 21, pp. 7405–7415. doi: 10.1128/JB.00758-06
87. Harter E., Wagner E.M., Zaiser A., Halecker S., Wagner M., Rychli K. Stress Survival Islet 2, Predominantly Present in *Listeria monocytogenes* Strains of Sequence Type 121, Is Involved in the Alkaline and Oxidative Stress Responses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2017, vol. 83, no. 16: e00827-17. doi: 10.1128/AEM.00827-17
88. Hwang C.-A., Sheen S., Juneja V.K. Effect of salt, smoke compound, and temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* in salmon during simulated smoking processes. *J. Food Sci.*, 2009, vol. 74, no. 9, pp. 522–529. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01377.x
89. Jadhav S., Gulati V., Fox E.M., Karpe A., Beale D.J., Sevier D., Bhawe M., Palombo E.A. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-ToF mass spectrometry. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, vol. 202, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023
90. Jadhav S., Bhawe M., Palombo E.A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods*, 2012, vol. 88, no. 3, pp. 327–341. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.002
91. Jagadeesan B., Koo O.K., Kim K.-P., Burkholder K.M., Mishra K.K., Aroonnu A., Bhunia A.K. LAP, an alcohol acetaldehyde dehydrogenase enzyme in *Listeria* promotes bacterial adhesion to enterocyte-like Caco-2 cells only in pathogenic species. *Microbiology*, 2010, vol. 156, no. 9, pp. 2782–2795. doi: 10.1099/mic.0.036509-0
92. Jahan M., Holley R.A. Transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2016, vol. 62, no. 4, pp. 304–310. doi: 10.1111/lam.12553
93. Junttila J.R., Niemela S.I., Hirn J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1988, vol. 65, no. 4, pp. 321–327. doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb01898.x
94. Kaszoni-Rückerl I., Mustedanagic A., Muri-Klinger S., Brugger K., Wagner K.H., Wagner M., Stessl B. Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 2: 234. doi: 10.3390/microorganisms8020234
95. Kathariou S., Kanenaka R., Allen R.D., Fok A.K., Mizumoto C. Repression of motility and flagellin production at 37 degrees C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*. *Can. J. Microbiol.*, 1995, vol. 41, no. 7, pp. 572–577. doi: 10.1139/m95-076
96. Keeney K.M., Stuckey J.A., O’Riordan M.X.D. LplA1-dependent utilization of host lipoyl peptides enables *Listeria* cytosolic growth and virulence. *Mol. Microbiol.*, 2007, vol. 66, pp. 758–770. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05956.x
97. Koopmans M.M., Bijlsma M.W., Brouwer M.C., van de Beek D., van der Ende A. *Listeria monocytogenes* meningitis in the Netherlands, 1985–2014: A nationwide surveillance study. *J. Infect.*, 2017, vol. 75, no. 1, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.jinf.2017.04.004
98. Laksanalamai P., Huang B., Sabo J., Burall L.S., Zhao S., Bates J., Datta A.R. Genomic Characterization of Novel *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Variant Strains. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2: e89024. doi: 10.1371/journal.pone.0089024
99. Lang Halter E., Neuhaus K., Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a fresh water pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, vol. 63, pt 2, pp. 641–647. doi: 10.1099/ijs.0.036830-0
100. Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P.A., Le Fleche-Mateos A., Roche S.M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, vol. 60, no. 9, pp. 2210–2214. doi: 10.1099/ijs.0.017376-0
101. Lee S., Ward T.J., Graves L.M., Wolf L.A., Sperry K., Siletzky R.M., Kathariou S. Atypical *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains harboring a lineage II-specific gene cassette. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 78, no. 3, pp. 660–667. doi: 10.1128/AEM.06378-11
102. Li M., Yan S., Fanning S., Li F., Xu J. Whole Genome Analysis of Three Multi-Drug Resistant *Listeria innocua* and Genomic Insights Into Their Relatedness With Resistant *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12, pp. 694361–694369. doi: 10.3389/fmicb.2021.694361
103. Liao Y., Liu L., Zhou H., Fang F., Liu X. Case report: refractory *Listeria innocua* meningoencephalitis in a three-year-old boy. *Front. Pediatr.*, 2022, vol. 10, pp. 857900–857905. doi: 10.3389/fped.2022.857900
104. Locatelli A., Lewis M.A., Rothrock M.J.Jr. The Distribution of *Listeria* in Pasture-Raised Broiler Farm Soils Is Potentially Related to University of Vermont Medium Enrichment Bias toward *Listeria innocua* over *Listeria monocytogenes*. *Front. Vet. Sci.*, 2017, vol. 4, pp. 227–237. doi: 10.3389/fvets.2017.00227
105. Lomonaco S., Nucera D., Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect. Genet. Evol.*, 2015, vol. 35, pp. 172–183. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.008
106. Luque-Sastre L., Arroyo C., Fox E.M., McMahon B.J., Bai L., Li F., Fanning S. Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species. *Microbiol. Spectr.*, 2018, vol. 6, no. 4. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017
107. Maćkiw E., Stasiak M., Kowalska J., Kucharek K., Korsak D., Postupolski J. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products in Poland. *J. Food Prot.*, 2020, vol. 83, no. 6, pp. 1002–1009. doi: 10.4315/JFP-19-525
108. Manqele A., Gcebe N., Pierneef R.E., Moerane R., Adesiyun A.A. Identification of *Listeria* species and Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) Typing of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* Isolates from Cattle Farms and Beef and Beef-Based Products from Retail Outlets in Mpumalanga and North West Provinces, South Africa. *Pathogens*, 2023, vol. 12, no. 1, pp. 147. doi: 10.3390/pathogens12010147
109. Martín B., Bover-Cid S., Aymerich T. MLVA subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and meat processing plants. *Food Res. Int.*, 2018, vol. 106, pp. 225–232. doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.052
110. Matto C., D’Alessandro B., Mota M.I., Braga V., Buschiazzi A., Giannechini E., Varela G., Rivero R. *Listeria innocua* isolated from diseased ruminants harbour minor virulence genes of *L. monocytogenes*. *Vet. Med. Sci.*, 2022, vol. 8, no. 2, pp. 735–740. doi: 10.1002/vms3.710
111. Maury M.M., Bracq-Dieye H., Huang L., Vales G., Lavina M., Thouvenot P., Disson O., Leclercq A., Brisse S., Lecuit M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones’ adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.*, 2019, vol. 10, no. 1, pp. 2488–2500. doi: 10.1038/s41467-019-10380-0
112. Maury M.M., Tsai Y.-H.H., Charlier C., Touchon M., Chenal-Francois V., Leclercq A., Criscuolo A., Gaultier C., Roussel S., Brisabois A., Disson O., Rocha E.P.C., Brisse S., Lecuit M. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.*, 2016, vol. 48, pp. 308–313. doi: 10.1038/ng.3501

113. Meinersmann R., Phillips R.W., Wiedmann M., Berrang M.E. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 4, pp. 2193–2203. doi: 10.1128/AEM.70.4.2193-2203.2004
114. Meireles D., Pombinho R., Carvalho F., Sousa S., Cabane D. *Listeria monocytogenes* wall teichoic acid glycosylation promotes surface anchoring of virulence factors, resistance to antimicrobial peptides, and decreased susceptibility to antibiotics. *Pathogens*, 2020, vol. 9, no. 4, p. 290. doi: 10.3390/pathogens9040290
115. Melo J., Andrew P.W., Faleiro M.L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. *Food Res. Int.*, 2015, vol. 67, pp. 75–90. doi: 10.1016/j.foodres.2014.10.031
116. Milillo S.R., Friedly E.C., Saldivar J.C., Muthaiyan A., O'Bryan C., Crandall P.G., Johnson M.G., Ricke S.C. A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2012, vol. 52, no. 8, pp. 712–725. doi: 10.1080/10408398.2010.507909
117. Montazeri N., Himelbloom B.H., Oliveira A.C., Leigh M.B., Crapo C.A. Refined liquid smoke: a potential anti-*Listeria* additive to cold-smoked sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Food Prot.*, 2013, vol. 76, no. 5, pp. 812–819. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-368
118. Montero D., Bodero M., Riveros G., Lapierre L., Gaggero A., Vidal R.M., Vidal M. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6: 384. doi: 10.3389/fmicb.2015.00384
119. Murray E.G.D., Webb R.A., Swann M.B.R. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, 1926, vol. 29, no. 4, pp. 407–439. doi: 10.1002/path.1700290409
120. NicAogain K., O'Byrne C.P. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the food chain. *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7: 1865. doi: 10.3389/fmicb.2016.01865
121. Nightingale K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 16, pp. 5537–5551. doi: 10.1128/JB.187.16.5537-5551.2005
122. Norton D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: Toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.*, 2002, vol. 85, no. 2, pp. 505–515. doi: 10.1093/jaoac/85.2.505
123. Nunez-Montero K., Leclercq A., Moura A., Vales G., Peraza J., Pizarro-Cerda J., Lecuit M. *Listeria costaricensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, pp. 844–850. doi: 10.1099/ijsem.0.002596
124. O'Driscoll B., Gahan C.G.M., Hill C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, no. 5, pp. 1693–1698. doi: 10.1128/aem.62.5.1693-1698.1996
125. Ojima-Kato T., Yamamoto N., Takahashi H., Tamura H. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS) Can Precisely Discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 7: e0159730. doi: 10.1371/journal.pone.0159730
126. Orsi R.H., Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 100, no. 12, pp. 5273–5287. doi: 10.1007/s00253-016-7552-2
127. Osanai A., Li S.H., Asano K., Sashinami H., Hu D.L., Nakane A. Fibronectin-binding protein, FbpA, is the adhesin responsible for pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol. Immunol.*, 2013, vol. 57, pp. 253–262. doi: 10.1111/1348-0421.12030
128. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 2003, vol. 21, no. 6, pp. 465–499. doi: 10.1016/s0734-9750(03)00077-6
129. Paramithiotis S., Hadjilouka A., Drosinos E.H. *Listeria* Pathogenicity Island 1. Structure and function. In: *Listeria Monocytogenes: food sources, prevalence and management strategies*. Ed. E.C. Hambrick, 2014, pp. 265–282.
130. Patange A., O'Byrne C., Boehm D., Cullen P.J., Keener K., Bourke P. The effect of atmospheric cold plasma on bacterial stress responses and virulence using *Listeria monocytogenes* knockout mutants. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 2841. doi: 10.3389/fmicb.2019.02841
131. Poimenidou S.V., Dalmasso M., Papadimitriou K., Fox E.M., Skandamis P.N., Jordan K. Virulence Gene Sequencing Highlights Similarities and Differences in Sequences in *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains of Clinical and Food Origin From 3 Different Geographic Locations. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9: 1103. doi: 10.3389/fmicb.2018.01103
132. Quereda J.J., Nahori M.A., Meza-Torres J., Sachse M., Titos-Jiménez P., Gomez-Laguna J., Dussurget O., Cossart P., Pizarro-Cerdá J. Listeriolysin S is a streptolysin S-like virulence factor that targets exclusively prokaryotic cells in vivo. *mBio*, 2017, vol. 8, no. 2. doi: 10.1128/mbio.00259-17
133. Rae C.S., Geissler A., Adamson P.C., Portnoy D.A. Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyper induction of innate immune pathways. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 9, pp. 3596–3606. doi: 10.1128/IAI.00077-11
134. Raveneau J., Geoffroy C., Beretti J.L., Gaillard J.L., Alouf J.E., Berche P. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, pp. 916–921. doi: 10.1128/iai.60.3.916-921.1992
135. Réglie-Poupet H., Pellegrini E., Charbit A., Berche P. Identification of LpeA, a PsaA-like membrane protein that promotes cell entry by *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, pp. 474–482. doi: 10.1128/IAI.71.1.474-482.2003
136. Réglie-Poupet H., Frehel C., Dubail I., Beretti J.C., Berche P., Charbit A., Raynaud C. Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 49, pp. 49469–49477. doi: 10.1074/jbc.M307953200
137. Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Suarez M., Brehm K., Berche P., Vázquez-Boland J.-A. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in extracellular medium composition. *Res. Microbiol.*, 1996, vol. 147, no. 5, pp. 371–384. doi: 10.1016/0923-2508(96)84712-7
138. Ryser E.T., Marth E.H. *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed. Ed. E.T. Ryser. New York: Marcel Dekker Inc, 2007, 896 p. doi: 10.1201/9781420015188

139. Rocha P.R., Dalmasso A., Grattarola C., Casalone C., Del Piero F., Bottero M.T., Capucchio M.T. Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Res. Vet. Sci.*, 2013, vol. 94, no. 1, pp. 111–114. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.017
140. Rocourt J., Hof H., Schrettenbrunner A., Malinverni R., Bille J. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1986, vol. 116, no. 8, pp. 248–251
141. Ruiz-Llacsahuanga B., Hamilton A., Zaches R., Hanrahan I., Critzer F. Prevalence of *Listeria* Species on Food Contact Surfaces in Washington State Apple Packinghouses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2021, vol. 87, no. 9: e02932-20. doi: 10.1128/AEM.02932-20
142. Salimnia H., Patel D., Lephart P.R., Fairfax M.R., Chandrasekar P.H. *Listeria grayi*: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 526–528. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00539.x
143. Schlüter D., Domann E., Buck C., Hain T., Hof H., Chakraborty T., Deckert-Schlüter M. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 12, pp. 5930–5938. doi: 10.1128/iai.66.12.5930-5938.1998
144. Shen Y., Liu Y., Zhang Y., Cripe J., Conway W., Meng J., Hall G., Bhagwat A.A. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 7, pp. 5073–5076. doi: 10.1128/aem.00435-06
145. Somers E.B., Wong A.C.L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials on the presence of ready-to-eat meat residue. *J. Food Prot.*, 2004, vol. 76, no. 10, pp. 2218–2229. doi: 10.4315/0362-028x-67.10.2218
146. Stülke J., Hillen W. Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 54, no. 1, pp. 849–880. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.849
147. Sue D., Fink D., Wiedmann M., Boor K.J. σ B-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology*, 2004, vol. 150, pt 11, pp. 3843–3855. doi: 10.1099/mic.0.27257-0
148. Swaminathan B., Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.*, 2007, vol. 9, no. 10, pp. 1236–1243. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
149. Travier L., Guadagnini S., Gouin E., Dufour A., Chenal-Francisque V., Cossart P., Olivo-Marin J.-Ch., Ghigo J.-M., Disson O., Lecuit M. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 1: e1003131. doi: 10.1371/journal.ppat.1003131
150. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *J. Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, vol. 14, no. 3, pp. 584–640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001
151. Vilchis-Rangel R.E., Espinoza-Mellado M.D.R., Salinas-Jaramillo I.J., Martínez-Pena M.D., Rodas-Suarez O.R. Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker llsX with invasiveness. *Curr. Microbiol.*, 2019, vol. 76, no. 5, pp. 637–643. doi: 10.1007/s00284-019-01671-2
152. Weller D., Andrus A., Wiedmann M., Den Bakker H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, pt 1, pp. 286–292. doi: 10.1099/ij.s.0.070839-0
153. Williams D., Castleman J., Lee Ch., Mote B., Smith M.A. Risk of fetal mortality after exposure to *Listeria monocytogenes* based on dose-response data from pregnant guinea pigs and primates. *Risk Anal.*, 2009, vol. 29, no. 11, pp. 1495–1505. doi: 10.1111/j.1539-6924.2009.01308.x
154. Zhang Y., Dong S., Chen H., Chen J., Zhang J., Zhang Z., Yang Y., Xu Z., Zhan L., Mei L. Prevalence, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* From Retail Foods in Bulk in Zhejiang Province, China. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 1710. doi: 10.3389/fmicb.2019.01710

Авторы:

Деревянченко И.А., биолог бактериологической лаборатории Восточного филиала ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербурге и Ленинградской области, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Краева Л.А., д.м.н., доцент, зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Derevyanchenko I.A., Biologist at the Bacteriological Laboratory, Eastern Branch of the Center for Hygiene and Epidemiology in the city of St. Petersburg and the Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kraeva L.A., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.04.2024
 Принята к печати 09.08.2024

Received 14.04.2024
 Accepted 09.08.2024

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗНЫМ СУБЛИНИЯМ ОМИКРОН-ВАРИАНТА, В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК МЫШЕЙ

А.В. Зайковская, В.А. Евсеенко, С.Е. Олькин, О.В. Пьянков

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия

Резюме. Введение. Возникновение и распространение новых генетических вариантов SARS-CoV-2 является причиной периодического подъема заболеваемости COVID-19. Показано, что наиболее быстро распространяющиеся генетические варианты SARS-CoV-2, устойчивы к антителам, специфичным предшествующим вариантам коронавируса, что делает необходимым проведение анализа способности уклонения от антител к ранее циркулировавшим вариантам для вновь возникающих субвариантов. Целью работы явилось изучение кросс-реактивности штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим субвариантам Омикрона, которые были выделены на территории РФ в период 2020–2023 гг. в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей. **Материалы и методы.** Мышиные гипериммунные сыворотки получены к 10 штаммам коронавируса SARS-CoV-2, относящимся к субвариантам BA.1, BA.2, CH.1.1, BN.1, BA.5.1, CL.1.2, BA.5.2, BQ.1.2.1 XBB 1,5 и XBB.3. Мышей линии BALB/c иммунизировали инактивированным концентрированным антигеном в смеси с адъювантом 1:1, в качестве которого использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*). Титр антител определяли в реакции нейтрализации. Анализ нейтрализующей активности гипериммунных сывороток проводили в отношении к вирусам, к которым были получены сыворотки, а также к ранним генетическим вариантам SARS-CoV-2 (Ухань, Альфа, Бета, Гамма, Дельта). **Результаты.** Показано, наличие кросс-реактивности для всех штаммов Омикрон-варианта, использованных в эксперименте, степень кросс-реактивности зависела от степени родства штаммов. Выраженная кросс-реактивность показана для штаммов, которые являются субвариантами BA.5, в отношении рекомбинантных линий SARS-CoV-2 их нейтрализующая активность существенно снижена. Нейтрализующие титры сывороток, полученных к штаммам, являющимися субвариантами BA.5, в отношении генетических вариантов SARS-CoV-2, которые

Адрес для переписки:

Зайковская Анна Владимировна
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (383) 363-47-00, доп. 2004.
E-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Contacts:

Anna V. Zaykovskaya
630559, Russian Federation, Novosibirsk region, Koltsovo,
State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (383) 363-47-00, доп. 2004.
E-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Для цитирования:

Зайковская А.В., Евсеенко В.А., Олькин С.Е., Пьянков О.В. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным сублиниям Омикрон-варианта, в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 881–890. doi: 10.15789/2220-7619-AFO-17591

Citation:

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V. Antigenic features of the strains SARS-CoV-2 of omicron sublines assessed by hyperimmune mouse serum neutralisation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 881–890. doi: 10.15789/2220-7619-AFO-17591

были выделены в ранние периоды пандемии снижены более чем в 60 раз. **Выводы.** Представленный метод получения и использования гипериммунных сывороток мышей для реакции нейтрализации позволяет оценить кросс-реактивность для штаммов, относящихся к разным субвариантам SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19, коронавирус SARS-CoV-2, антитела, кросс-реактивность, гипериммунные сыворотки, реакция нейтрализации.

ANTIGENIC FEATURES OF THE STRAINS SARS-CoV-2 OF OMICRON SUBLINES ASSESSED BY HYPERIMMUNE MOUSE SERUM NEUTRALISATION

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* The emergence and spread of new genetic variants of SARS-CoV-2 underlies periodic upsurge in COVID-19 incidence. It has been shown that the most rapidly spreading genetic variants of SARS-CoV-2 are resistant to antibodies specific to the previous variant of the SARS-CoV-2, thereby necessitating to analyze the antibody evasion ability of previously circulating variants for newly emerging subvariants. The aim of this work was to assess SARS-CoV-2 cross-reactivity of coronavirus strains belonging to different genetic subvariants of Omicron isolated in the territory of the Russian Federation in the period 2020–2023 in microneutralization reaction using hyperimmune mouse sera. *Materials and methods.* Mouse hyperimmune sera were obtained against 10 SARS-CoV-2 strains belonging to subvariants BA.1, BA.2, CH.1.1, BN.1, BA.5.1, CL.1.2, BA.5.2, BQ.1.2.1 XBB.1.5 and XBB.3. BALB/c mice were immunized with inactivated concentrated antigen mixed at 1:1 ratio with an adjuvant representing Quillaja saponaria saponin-based virus-like immunostimulatory complex. The antibody titer was determined by neutralization test. The neutralizing activity of the hyperimmune sera was analyzed against the relevant viruses as well as against previous genetic variants of SARS-CoV-2 (Wuhan, Alpha, Beta, Gamma, Delta). *Results.* Cross-reactivity for all Omicron-variant strains analyzed here was shown; the degree of cross-reactivity depended on the degree of inter-strain relatedness. A prominent cross-reactivity was observed for subvariants of BA.5 so that their neutralizing activity against recombinant SARS-CoV-2 lineages was markedly reduced. Neutralizing serum titers obtained for subvariants of BA.5 against genetic variants of SARS-CoV-2 isolated during the early periods of the pandemic are reduced more than 60-fold. *Conclusion.* The presented method for obtaining and using hyperimmune mouse sera for neutralization reaction allows the assessment of cross-reactivity for strains belonging to different SARS-CoV-2 subvariants.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, coronavirus, antibodies, cross-reactivity, hyperimmune sera, test neutralization.

Введение

Возникновение и распространение новых генетических вариантов SARS-CoV-2 является причиной периодического подъема заболеваемости COVID-19. Омикрон вариант (B.1.1.529) впервые был выявлен в ноябре 2021 г. в Южной Африке, по сравнению с предшествующими генетическими вариантами SARS-CoV-2 (Альфа, Бета, Гамма, Дельта) его геном содержал наибольшее количество мутаций. Он быстро распространился по всему миру и вытеснил предыдущий доминирующий Дельта-вариант SARS-CoV-2 [3]. С появлением Омикрон-варианта эволюция коронавируса SARS-CoV-2 заметно ускорилась. Первая известная генетическая линия BA.1 варианта Омикрон была быстро вытеснена субвариантом BA.2, который обладал более высокой трансмиссивностью по сравнению с BA.1, а также способностью уклоняться от иммунного ответа, что позволило повторно заражать лиц, ранее переболевших BA.1 [12]. Накопление мутаций в разных комбинациях способствовало появлению в быстрой последовательности большого числа субвариантов BA.2, которые циркулирова-

ли одновременно, наиболее распространенными из них стали BA.2.75 и BA.4/5 [7, 24]. Субвариант BA.5 стал доминирующим вариантом в мире с августа 2022 г. [9, 16]. Результатом дальнейшей эволюции SARS-CoV-2 явилось появление субвариантов BA.4.6, BF.7, CL.1, BQ.1 и др. (потомки BA.4/5), а также BA.2.75.2, CH.1, BN.1 и др. (потомки BA.2.75) [14, 19, 21]. В результате рекомбинации между BJ.1 и BM.1.1.1 (субварианты BA.2) возник XBB-вариант, который содержал 14 мутаций в дополнении к тем, которые ранее были обнаружены у BA.2. Субварианты XBB вызвали очередной подъем заболеваемости во многих странах мира [28].

Показано, что наиболее быстро распространяющиеся субварианты SARS-CoV-2, как правило, устойчивы к гуморальному иммунитету, индуцированному предшествующим вариантом коронавируса [24]. Например, показана устойчивость Омикрон-варианта к сывороткам, полученным в результате инфицирования Дельта-вариантом [23]. Вирусы субварианта BA.2 устойчивы к сывороткам, полученным от переболевших BA.1, а штаммы, относящиеся к субварианту BA.5 устойчивы к сыворот-

кам переболевших BA.2, вирусы субвариантов BQ.1.1 и XBB эффективно уклоняются от гуморального иммунитета после перенесенной инфекции BA.5 [19, 28]. Таким образом, приобретение иммунной устойчивости является одним из важных факторов в вытеснении предыдущих генетических вариантов SARS-CoV-2.

Вирус SARS-CoV-2 находится в процессе эволюционного развития, что требует непрерывных научных исследований с использованием не только передовых методов анализа его генетических последовательностей, но и способности уклонения от антител, индуцированных ранее циркулировавшими вариантами, для вновь возникающих генетических субвариантов.

Целью работы явилось изучение кросс-реактивности штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к субвариантам Омикрона, которые были выделены на территории РФ в период 2020–2023 гг. в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей.

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали культуру клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) с L-глутамином, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), Antibiotic-Antimycotic (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) в атмосфере с 5% CO₂.

Вирусы. Эксперименты с инфекционным материалом были проведены в лаборатории, соответствующей уровню биобезопасности BSL-3. В работе использовали штаммы коронавируса SARS-CoV-2, депонированные в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Информация о штаммах коронавируса SARS-CoV-2, использованных в эксперименте представлены в табл. 1. Штаммы вирусов были наработаны на культуре клеток Vero E6, для проведения реакции нейтрализации были приготовлены аликвоты, которые хранили при –80°C.

Подготовка антигенов проведена как было описано ранее [1]. Кратко. Пулы вируса наработаны на культуре клеток Vero E6, концентрированы при помощи центрифужных концентраторов (50 kDa, Amicon Ultra-15, Merck (Millipore)), инактивацию проводили бета пропиолактоном (BPL) (Acros Organics).

Получение мышинных гипериммунных сывороток. Для иммунизации были использованы мыши

линии BALB/c массой 18–20 г (Питомник лабораторных животных, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). По 6 животных в каждой группе. Инактивированный антиген вводили животным внутримышечно двукратно с интервалом 3 недели по 0,1 мл/животное в смеси с адьювантом 1:1. В качестве адьюванта использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы (ИСКОМ) на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*) в концентрации 160 мкг/мл. Содержание сапонинов Квиллайи мыльной в ИСКОМ адьюванте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu) как было описано ранее [1].

Отбор проб крови был проведен под инъекционным внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbac, Франция) из орбитального синуса через 6 недель после начала иммунизации. Все эксперименты на животных были одобрены Биоэтическим комитетом Центра и проводились согласно соответствующим национальным и международным руководящим принципам по уходу и гуманному использованию животных.

Реакция нейтрализации проведена на культуре клеток Vero E6 как было описано ранее [1]. Кратко. Начальное разведение сывороток животных 1:10. Рабочая концентрация вируса — 100 ТЦД₅₀/0,1мл. Результат учитывали визуально по наличию ЦПД после окрашивания раствором генцианвиолета. Титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не регистрировали.

Анализ данных. Анализ данных проведен с использованием программы Microsoft Excel, Statistica v13.0. Для значений титров вируснейтрализующих антител вычисляли среднее геометрическое обратных титров. При математических вычислениях среднего геометрического значения обратных титров ниже 10 приняты за 5. Значение 5 является обратным титром разведения предыдущего первому использованному в реакции. Статистическую значимость разницы титров антител оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни. Достоверной считали разницу при $p < 0,05$.

Результаты

Были получены мышинные гипериммунные сыворотки к 10 штаммам коронавируса SARS-CoV-2, относящимся к разным субвариантам Омикрона, которые были выделены на территории РФ в период 2021–2023 гг. Исследована их нейтрализующая активность в отношении вирусов к которым они были получены, а также в отношении штаммов, циркулировавших в ранние периоды пандемии (табл. 2).

Для описания результатов анализа штаммы коронавируса SARS-CoV-2, использованные в эксперименте, были сгруппированы согласно их родству и времени выделения. В тексте для указания штамма использовали сокращенное буквенное обозначение согласно классификации Pango (табл. 1).

Штаммы BA.1 и BA.2, были выделены в конце 2021 г. и начале 2022 г соответственно. Гипериммунные сыворотки мышей, полученные к этим штаммам, хранили при -20°C в течение года, за это время их титр уменьшился в среднем в 2 раза. Выявлено достоверное снижение нейтрализующей активности сывороток, специфичных к BA.1 и BA.2 в отношении всех штаммов вирусов, использованных в эксперименте.

Два штамма BN.1.3 и CH.1.1, к которым были получены мышинные гипериммунные сыворотки, являются субвариантами BA.2.75. Аминокислотные последовательности S-белка этих штаммов имеют различия в пяти позициях: штамм BN.1.3 имеет мутации K356T и F490S, CH.1.1 характеризуется наличием K444T, L452R,

F486S. Было показано, что четыре из этих мутаций влияют на уклонение от иммунитета [8, 21].

Титры сывороток к гомологичному штамму BN.1.3 относительно низкие. Достоверное снижение нейтрализующей активности этих сывороток выявлены по отношению к CH.1.1 (в 12,7 раз), а также к штаммам BA.2, BA.5.1, BA.5.2, BQ.1.2.1, XBB 1.5.

Заслуживают внимания результаты анализа кросс-реактивности для штамма CH.1.1. Нейтрализующая активность сывороток, полученных к этому вирусу, с гомологичным штаммом ниже, чем с остальными штаммами вируса, использованными в эксперименте. Титры нейтрализации для сывороток, полученных ко всем вирусам, использованным в эксперименте, по отношению к штамму CH.1.1 существенно снижены или ниже порога обнаружения, при этом контроли рабочего титра вируса, при постановке реакции нейтрализации, не были нарушены, что говорит о повышенной способности штамма уклоняться от вируснейтрализующих антител.

Таблица 1. Информация о штаммах коронавируса SARS-CoV-2, использованных в эксперименте

Table 1. Data on SARS-CoV-2 coronavirus strains, used for experiment

Сокращения названия штамма Abbreviations of the strain name	Название штамма, GISAID ID Name of the strain, GISAID ID	Генетическая линия (альтернативное название) [17] Genetic lineage (Alias) [17]
Ухань Wuhan	hCoV-19/Australia/VIC01/2020, EPI_ISL_406844	B.1
Альфа Alfa	hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020, EPI_ISL_6565012	B.1.1.7
Бета Beta	hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021, EPI_ISL_6492245	B.1.351
Гамма Gamma	hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021, EPI_ISL_6565014	B.1.1.28.1
Дельта Delta	hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021, EPI_ISL_7338814	B.1.617.2
BA.1	hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021, EPI_ISL_8920444	B.1.1.529
BA.2	hCoV-19/Russia/Amursk-1603/2022, EPI_ISL_12809000	B.1.1.529.2
CH.1.1	hCoV-19/Russia/OMS-SRC-8455/2023, EPI_ISL_17730071	B.1.1.529.2.75.3.4.1.1.1.1
BN.1.3	hCov-19/Russia/NVS-SRC-8571/2023, EPI_ISL_17678725	B.1.1.529.2.75.5.1.3
BA.5.1	hCoV-19/Russia/Moscow-48571/2022, EPI_ISL_16613435	B.1.1.529.5.1
CL.1.2	hCov-19/Russia/NVS-SRC-8572/2023, EPI_ISL_17678727	B.1.1.529.5.1.29.1.2
BA.5.2	hCoV-19/Russia/Moscow-49415/2022, EPI_ISL_16613436	B.1.1.529.5.2
BQ.1.2.1	hCoV-19/Russia/KHA-SRC-8469/2023, EPI_ISL_17730077	B.1.1.529.5.3.1.1.1.1.2.1
XBB.1.5	hCov-19/Russia/TYU-SRC-8642/2023, EPI_ISL_17770464	XBB.1.5
XBB.3	hCov-19/Russia/NVS-SRC-5581/2023, EPI_ISL_16520275	XBB.3

Таблица 2. Кросс-реактивность штаммов, относящихся к разным субвариантам Омикрона, в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей

Table 2. Cross-reactivity of the SARS CoV-2 strains of Omicron subvariants analyzed by neutralization test with hyperimmune mouse sera

Штамм вируса, к которому были получены гипериммунные сыворотки Virus strain with obtained hyperimmune serums	Штамм вируса, использованный в реакции нейтрализации Virus strains used in neutralization test									
	ВА.1	ВА.2	СН.1.1	ВН.1.3	ВА.5.1	СЛ.1.2	ВА.5.2	ВQ.1.2.1	ХВВ.1.5	ХВВ.3
ВА.1	905,1 (320–1280)	160,0* (80–320)	7,8* (5–40)	100,8* (40–640)	11,2* (5–80)	28,3* (20–40)	20,0* (10–80)	89,8* (20–320)	17,8* (5–40)	71,3* (40–160)
ВА.2	50,4* (20–160)	253,9 (160–640)	5,0* (5–5)	22,4* (20–40)	20,0* (5–80)	17,8* (10–40)	44,9* (20–80)	80,0* (40–160)	31,7* (10–80)	69,6* (80–160)
СН.1.1	452,6 (160–1280)	320,0 (80–640)	226,3 (80–1280)	320,0 (80–1280)	671,1 (320–1280)	320,0 (160–1280)	320,0 (40–2560)	640,0 (320–1280)	380,5 (160–640)	320,0 (160–640)
ВН.1.3	45,9 (20–80)	11,2* (5–40)	5,6* (5–10)	71,3 (40–320)	15,9* (5–40)	28,3 (10–160)	31,7* (20–80)	20,0* (10–80)	20,0* (5–80)	45,9 (20–80)
ВА.5.1	452,5* (160–1280)	403,2* (80–1280)	22,4* (10–80)	35,6* (20–80)	2031,5 (640–5120)	89,8* (20–640)	2280,7 (1280–5120)	127,0* (40–640)	50,4* (20–80)	142,5* (40–320)
СЛ.1.2	40,0* (10–80)	320,0* (160–1280)	100,8* (80–160)	100,8* (40–160)	1280,0 (640–2560)	1612,7 (1280–2560)	1280,0 (640–2560)	1280,0 (640–2560)	508,0* (320–640)	452,5* (160–640)
ВА.5.2	285,1* (160–640)	142,5* (80–320)	14,1* (5–40)	40,0* (20–80)	1280,0 (640–2560)	80,0* (40–160)	1436,8 (1280–2560)	113,1* (40–320)	56,6* (20–160)	142,5* (40–320)
ВQ.1.2.1	71,3* (40–160)	179,6 (20–1280)	40,0* (5–160)	142,5* (40–640)	403,2 (80–1280)	452,5 (160–1280)	806,3 (160–2560)	1015,9 (320–2560)	640,0 (160–1280)	403,2 (80–1280)
ХВВ.1.5	20,0* (10–80)	35,6* (5–160)	7,1* (5–10)	80,0* (10–320)	10,0* (5–40)	44,9* (20–80)	22,4* (5–40)	50,4* (20–160)	211,1 (160–320)	69,6 (10–320)
ХВВ.3	17,8* (10–40)	80,0* (10–160)	13,5* (5–20)	26,9* (20–40)	71,3 (40–160)	12,2* (5–20)	107,7 (40–160)	29,7* (10–80)	97,5 (40–160)	176,7 (80–320)

Примечание. Значения указаны в виде среднего геометрического обратного титра сывороток (наименьшее значение – наибольшее значение). Титры ниже 10 приняты за 5. Серым выделен результат с гомологичным антигеном. *Статистическая значимость при $p < 0,05$, анализ проведен с помощью U-теста Манна–Уитни.

Note. Values are presented as the geometric mean of serum inverse titers (the lowest value is the highest value). Titers below 10 are taken as 5. The result with the homologous antigen highlighted in gray. *Significance level at $p < 0,05$, analysis performed using Mann–Whitney U-test.

Была проанализирована кросс-реактивность для четырех штаммов, которые являются субвариантами ВА.5 (ВА.5.1, CL.1.2, ВА.5.2 и BQ.1.2.1). Сыворотки, полученные к этим штаммам, характеризуются высокими титрами нейтрализации с гомологичными штаммами. Антитела, специфичные к CL.1.2 и BQ.1.2.1, успешно нейтрализуют все вирусы этой группы. Нейтрализующая активность сывороток, полученных к штаммам ВА.5.1 и ВА.5.2 в отношении CL.1.2 и BQ.1.2.1 достоверно снижена. Аминокислотные последовательности S-белка штаммов ВА.5.1 и ВА.5.2 отличаются наличием только одной мутации R682P у ВА.5.1, последовательности штаммов CL.1.2 и BQ.1.2.1 имеют различия в 7 позициях. Если сравнить последовательность ВА.5.2 с CL.1.2 и BQ.1.2.1 — имеются отличия по восьми позициям для каждого штамма.

Достоверные различия для гипериммунных сывороток, полученных к штаммам относящихся к субвариантам ВА.5, выявлены с ВА.1, ВА.2, потомками ВА.2.75 и ХВВ вариантами. Исключением является отсутствие достоверных различий титров нейтрализации для сывороток специфичных штамму BQ.1.2.1 с ВА.2 и ХВВ вариантами.

В работе были использованы два ХВВ варианта — ХВВ.1.5 и ХВВ.3, наблюдается достоверное снижение нейтрализующей активности сывороток гомологичных этим штаммам в отношении практически всех вирусов, использованных в эксперименте, за исключением различий активности антител, специфичных к ХВВ.3 в отношении ВА.5.1 и ВА.5.2.

Результаты анализа нейтрализующей активности сывороток, полученных к разным субвариантам Омикрона в отношении ранних генетических вариантов SARS-CoV-2 (табл. 3) указывают на то, что нейтрализующая активность сывороток для всех ранних генетических линий, использованных в эксперименте, достоверно снижена. Следует отметить, что для вирусов, к которым титры нейтрализации сывороток с гомологичным штаммом были ниже 1:1000, полноценный анализ кросс-реактивности провести не удалось так как титры нейтрализации были ниже предела обнаружения. Титры сывороток, полученных к штаммам ВА.5.1, CL.1.2, ВА.5.2 против ранних вариантов коронавируса снижены более чем в 60 раз, специфичных штамму BQ.1.2.1 — более чем в 25 раз.

Таблица 3. Результаты реакции нейтрализации гипериммунных сывороток мышей, полученных к различным субвариантам Омикрона, с ранними генетическими вариантами коронавируса SARS-CoV-2

Table 3. The results of neutralization test with hyperimmune mouse sera obtained against strains of Omicron subvariants with different SARS-CoV-2 genetic variants

Штамм вируса, к которому были получены гипериммунные сыворотки Virus strain with obtained hyperimmune sera	Штамм вируса, использованный в реакции нейтрализации Virus strains used in neutralization test					
	Ухань Wuhan	Альфа Alfa	Бета Beta	Гамма Gamma	Дельта Delta	Гомологичный штамм Homologous antigen
CH.1.1	15,9* (10–40)	6,3* (5–10)	15,9* (10–20)	7,9* (5–10)	31,7* (20–80)	226,3 (80–1280)
BN.1.3	5,0* (5–5)	5,0* (5–5)	5,0* (5–5)	5,0* (5–5)	31,7* (10–80)	71,3 (40–320)
ВА.5.1	31,7* (20–40)	20,0* (10–40)	20,0* (5–80)	15,9* (5–40)	12,6* (10–20)	2031,5 (640–5120)
CL.1.2	12,6* (10–20)	6,3* (5–10)	7,9* (5–10)	25,2* (10–40)	6,3* (5–10)	1612,7 (1280–2560)
ВА.5.2	15,9* (5–80)	12,6* (10–20)	12,6* (5–40)	10,0* (5–40)	15,9* (10–40)	1436,8 (1280–2560)
BQ.1.2.1	25,2* (10–40)	20,0* (10–40)	15,9* (10–20)	40,0* (20–80)	25,2* (10–40)	1015,9 (320–2560)
ХВВ.1.5	6,3* (5–10)	5,0* (5–5)	6,3* (5–10)	5,0* (5–5)	7,9* (5–10)	211,1 (160–320)
ХВВ.3	10,0* (5–20)	10,0* (5–10)	14,1* (5–40)	14,1* (5–40)	7,1* (5–10)	176,7 (80–320)

Примечание. Значения указаны в виде среднего геометрического обратного титра сывороток (наименьшее значение – наибольшее значение). Титры ниже 10 приняты за 5. Серым выделен результат с гомологичным антигеном. *Статистическая значимость при $p < 0,05$, анализ проведен с помощью U-теста Манна–Уитни.

Note. Values are presented as the geometric mean of serum inverse titers (the lowest value is the highest value). Titers below 10 are taken as 5. The result with the homologous antigen highlighted in gray. *Significance level at $p < 0,05$, analysis performed using Mann–Whitney U-test.

Обсуждение

Мышиные гипериммунные сыворотки были получены к штаммам BA.1, BA.2, двум штаммам (СН.1.1 и BN.1), которые являются потомками BA.2.75, штаммам BA.5.1, CL.1.2, BA.5.2, BQ.1.2.1 предком которых является BA.5, и двум штаммам, относящимся к ХВВ вариантам (ХВВ.1.5 и ХВВ.3).

Высокая степень кросс-реактивности показана для штаммов, которые являются субвариантами BA.5. Штаммы BA.5.1, BA.5.2 были выделены в августе и сентябре 2022 г. соответственно, их аминокислотные последовательности S-белка имеют различия только в одном сайте. Штаммы CL.1.2 и BQ.1.2.1 были выделены позднее — весной 2023 г., являются более поздними потомками BA.5 и накопили больше мутаций, они успешно нейтрализуют антитела, специфичные к более ранним потомкам BA.5 — BA.5.1 и BA.5.2, в то время как нейтрализующая активность для штаммов BA.5.1 и BA.5.2 по отношению к их потомкам, которые сильно мутировали, снижена более чем в 12 раз. Для штаммов имеющих, рекомбинантное происхождение, кросс-реактивность снижена в большей степени, в отношении генетических вариантов SARS-CoV-2, которые были выделены в ранние периоды пандемии различия выражены еще сильнее.

Результаты нашей работы, а также литературные сведения показали выраженную способность уклоняться от вируснейтрализующих антител для СН.1.1 [5, 11, 20], что указывает на наличие у него потенциала для быстрого распространения. Этот генетический вариант SARS-CoV-2 включен в список вариантов под наблюдением (VBM) [25], в начале 2023 г. он был распространен в Европе [4], однако его появление не привело к увеличению числа новых случаев в России [20].

В литературных источниках представлено много результатов исследований, посвященных изучению возможности повторного инфицирования пациентов, ранее перенесших COVID-19, новыми субвариантами SARS-CoV-2. Далее при указании субварианта SARS-CoV-2 были использованы только буквенное обозначение согласно классификации Pango. Например, Lavezzo E. и соавт. показали снижение нейтрализующей активности сывороток переболевших COVID-19, собранных в начале пандемии, против дельта VOC (B.1.617.2) и омикрон VOC (BA.1) в 4 и 16 раз соответственно по сравнению с исходным штаммом B.1 [15]. Jiang X.L. и соавт. показали, что нейтрализующая активность сывороток, переболевших BA.1, в отношении BQ.1 была снижена в 17,7 раз по сравнению с BA.1, при этом только 47,4% образцов сывороток были способны нейтрализовать BQ.1.1 [13].

Однако в дальнейшем с вовлечением в пандемический процесс все большего процента населения, после внедрения вакцинных препаратов, с нарастанием разнообразия генетических вариантов SARS-CoV-2, возникновения случаев повторного заражения большинство образцов сывороток имеет сложный анамнез. В большинстве исследований используются сыворотки пациентов, которые содержат антитела, полученные в результате и иммунизации, и перенесенной инфекции (гибридный иммунитет).

Например, Uraiki R. и соавт. использовали для реакции нейтрализации с инфекционными изолятами SARS-CoV-2 образцы плазмы крови пациентов, вакцинированных мРНК BNT162b2 или mRNA-1273 и в последующем переболевших BA.2. Было показано, что большинство этих образцов нейтрализовали BQ.1.1 и ХВВ, однако титры нейтрализации в отношении BQ.1.1 и ХВВ были в 4,9 раз и 15,1 раз ниже, чем против BA.5 и BA.2 соответственно [27].

Наиболее часто исследования кросс-реактивности проводят с использованием для теста нейтрализации псевдовиральных частиц. Для реакции нейтрализации Wang Q. и соавт. использовали псевдовиральную систему на основе вируса везикулярного стоматита (VSV) и сыворотки крови с гибридным иммунитетом после перенесенной инфекции BA.1 или BA.2. Было показано, что титры нейтрализации против BA.2.75 были 1,8 раза ниже, чем против BA.2, но в 1,7 раз выше, чем против BA.4/5 [29]. В исследованиях Cao Y. и соавт. использовали плазму крови от добровольцев, трехкратно вакцинированных и переболевших BA.1. Показано снижение титра нейтрализации в отношении BA.4/5 в 8 раз по сравнению с титром нейтрализации к BA.1 [6].

Qu P. и соавт. с использованием лентивирусной системы показали, что сыворотки пациентов с гибридным иммунитетом, переболевших в период BA.1 или BA.4/5 волн пандемии обладают высокой устойчивостью к нейтрализации против BQ.1, BQ.1.1 и BA.2.75.2 [20]. А титры нейтрализации этих же образцов сывороток в отношении ХВВ.1.5 и СН.1.1 были в среднем в 14,6–7,3 и 16,7–20,5 раза ниже, чем с BA.4/5, соответственно [22].

Результаты, описанные в литературных источниках, согласуются с полученными нами результатами и подтверждают резкое снижение нейтрализующей активности сывороток, переболевших ранними вариантами коронавируса в отношении новых субвариантов. Однако большинство авторов представляют данные, полученные с использованием сывороток от пациентов с гибридным иммунитетом. Было показано, что нейтрализующие титры сывороток с гибридным иммунитетом существенно выше по сравнению с таковыми после моноинфекции [18], и результаты анализа кросс-

реактивности для образцов с гибридным иммунитетом и моноинфекцией могут существенно отличаться. Кроме того, к настоящему времени поиск добровольцев с наличием в анамнезе моноинфекции становится затруднительным.

Результаты представленной работы свидетельствуют о том, что кросс-реактивность для субвариантов SARS-CoV-2 может быть оценена с использованием гипериммунных мышинных сывороток в реакции нейтрализации.

Поскольку новые антигенно отличающиеся варианты SARS-CoV-2 продолжают появляться, и новые мутации позволяют вирусам лучше уклоняться от иммунитета, возникает вопрос о необходимости систематического надзора за антигенными вариантами SARS-CoV-2. Для осуществления этой задачи необходимо организовать сбор образцов сыворотки крови у добровольцев, которые были инфицированы циркулирующими известными субвариантами SARS-CoV-2. Этот процесс может быть существенно упрощен за счет получения панели гипериммунных сывороток животных к имеющимся генетическим вариантам вируса и вакцинным препаратам.

Такой подход скрининга для прогнозирования эволюционных направлений уже создан и успешно используется — существует глобальная система эпидемиологического надзора и ответных мероприятий за вирусом гриппа (GISRS), ответственная за отслеживание антигенной эволюции вирусов гриппа человека и выработку рекомендаций по составу вакцины, которая координируется ВОЗ [10].

Заключение

Представленный метод реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей позволяет оценить кросс-реактивность для штаммов, относящихся к разным генетическим вариантам и/или субвариантам SARS-CoV-2, что подтверждают результаты данной работы и предыдущие наши исследования [1]. Гипериммунные сыворотки мышей содержат антитела, специфичные к известному штамму, а использование ИСКОМ-адьюванта дает возможность получить сыворотки с высокими нейтрализующими титрами [2].

Было показано, наличие кросс-реактивности для всех штаммов Омикрон-варианта, использованных в эксперименте, степень кросс-реактивности зависела от степени родства штаммов. Выраженная кросс-реактивность показана для штаммов, относящихся к потомкам одного субварианта Омикрона (BA.5). В отношении рекомбинантных линий SARS-CoV-2 нейтрализующая активность существенно снижена. В отношении генетических вариантов SARS-CoV-2, которые были выделены в ранние периоды пандемии различия выражены еще сильнее.

Полученные результаты служат важной составляющей для формирования массива данных, необходимого для фундаментальных научных исследований в области иммунитета коронавируса, а также при работах, направленных на оптимизацию вакцинных композиций для профилактики COVID-19.

Список литературы/References

1. Зайковская А.В., Евсеенко В.А., Олькин С.Е., Пьянков О.В. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ в 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей // *Инфекция и иммунитет*. 2023. Т. 13, № 1. С. 37–45. [Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V. Investigating antigenic features of the SARS-CoV-2 isolated in Russian Federation in 2021–2022 by hyperimmune mouse serum neutralisation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 37–45. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998
2. Евсеенко В.А., Зайковская А.В., Гудымо А.С., Таранов О.С., Олькин С.Е., Иматдинов А.Р., Прудникова Е.Ю., Данильченко Н.В., Шульгина И.С., Косенко М.Н., Даниленко Е.И., Пьянков С.А., Рыжиков А.Б. Оценка гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на введение рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ИСКОМ-адьювантом // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023. Т. 23, № 5. С. 530–543. [Evseenko V.A., Zaykovskaya A.V., Gudymo A.S., Taranov O.S., Olkin S.E., Imatdinov A.R., Prudnikova E.Yu., Danilchenko N.V., Shulgina I.S., Kosenko M.N., Danilenko E.I., Pyankov S.A., Ryzhikov A.B. Evaluation of humoral immune responses of experimental animals to the recombinant SARS-CoV-2 spike ectodomain with the ISCOM adjuvant. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2023, vol. 23, no. 4, pp. 530–543. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543
3. Ao D., He X., Hong W., Wei X. The rapid rise of SARS-CoV-2 Omicron subvariants with immune evasion properties: XBB.1.5 and BQ.1.1 subvariants. *MedComm.*, 2023, no. 4: e239. doi: 10.1002/mco2.239
4. Bazzani L., Imperia E., Scarpa F., Sanna D., Casu M., Borsetti A., Pascarella S., Petrosillo N., Cella E., Giovanetti M., Ciccozzi M. SARS-CoV C.H.1.1 Variant: Genomic and Structural Insight. *Infect. Dis. Rep.*, 2023, vol. 15, no. 3, pp. 292–298. doi: 10.3390/idr15030029
5. Cao Y., Jian F., Wang J., Yu Y., Song W., Yisimayi A., Wang J., An R., Chen X., Zhang N., Wang Y., Wang P., Zhao L., Sun H., Yu L., Yang S., Niu X., Xiao T., Gu Q., Shao F., Hao X., Xu Y., Jin R., Shen Z., Wang Y., Xie X.S. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution. *Nature*, 2023, vol. 614, no. 7948, pp. 521–529. doi: 10.1038/s41586-022-05644-7

6. Cao Y., Yisimayi A., Jian F., Song W., Xiao T., Wang L., Du S., Wang J., Li Q., Chen X., Yu Y., Wang P., Zhang Z., Liu P., An R., Hao X., Wang Y., Wang J., Feng R., Sun H., Zhao L., Zhang W., Zhao D., Zheng J., Yu L., Li C., Zhang N., Wang R., Niu X., Yang S., Song X., Chai Y., Hu Y., Shi Y., Zheng L., Li Z., Gu Q., Shao F., Huang W., Jin R., Shen Z., Wang Y., Wang X., Xiao J., Xie X.S. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature*, 2022, vol. 608, no. 7923, pp. 593–602. doi: 10.1038/s41586-022-04980-y
7. Chen J., Wang R., Hozumi Y., Liu G., Qiu Y., Wei X., Wei G.W. Emerging Dominant SARS-CoV-2 Variants. *J. Chem. Inf. Model.*, 2023, vol. 63, no. 1, pp. 335–342. doi: 10.1021/acs.jcim.2c01352
8. Firouzabadi N., Ghasemiyeh P., Moradishooli F., Mohammadi-Samani S. Update on the effectiveness of COVID-19 vaccines on different variants of SARS-CoV-2. *Int. Immunopharmacol.*, 2023, vol. 17: 109968. doi: 10.1016/j.intimp.2023.109968
9. Hachmann N.P., Miller J., Collier A.Y., Ventura J.D., Yu J., Rowe M., Bondzie E.A., Powers O., Surve N., Hall K., Barouch D.H. Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Subvariants B.A.2.12.1, BA.4, and BA.5. *N. Engl. J. Med.*, 2022, vol. 387, no. 1, pp. 86–88. doi: 10.1056/NEJMc2206576
10. Hay A.J., McCauley J.W. The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)-A future perspective. *Influenza Other. Respir. Viruses*, 2018, vol. 12, no. 5, pp. 551–557. doi: 10.1111/irv.12565
11. Hu Y., Zou J., Kurhade C., Deng X., Chang H.C., Kim D.K., Shi P.Y., Ren P., Xie X. Less neutralization evasion of SARS-CoV-2 BA.2.86 than XBB sublineages and CH.1.1. *Emerg. Microbes Infect.*, 2023, vol. 12, no. 2: 2271089. doi: 10.1080/22221751.2023.2271089
12. Iketani S., Liu L., Guo Y., Liu L., Chan J.F., Huang Y., Wang M., Luo Y., Yu J., Chu H., Chik K.K., Yuen T.T., Yin M.T., Sobieszczyk M.E., Huang Y., Yuen K.Y., Wang H.H., Sheng Z., Ho D.D. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature*, 2022, vol. 604, no. 7906, pp. 553–556. doi: 10.1038/s41586-022-04594-4
13. Jiang X.L., Zhu K.L., Wang X.J., Wang G.L., Li Y.K., He X.J., Sun W.K., Huang P.X., Zhang J.Z., Gao H.X., Dai E.H., Ma M.J. Omicron B.Q.1 and BQ.1.1 escape neutralisation by omicron subvariant breakthrough infection. *Lancet. Infect. Dis.*, 2023, vol. 23, no. 1, pp. 28–30. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00805-2
14. Kurhade C., Zou J., Xia H., Liu M., Chang H.C., Ren P., Xie X., Shi P.Y. Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron B.A.2.75.2, BQ.1.1 and XBB.1 by parental mRNA vaccine or a BA.5 bivalent booster. *Nat. Med.*, 2023, vol. 29, no. 2, pp. 344–347. doi: 10.1038/s41591-022-02162-x
15. Lavezzo E., Pacenti M., Manuto L., Boldrin C., Cattai M., Grazioli M., Bianca F., Sartori M., Caldart F., Castelli G., Nicoletti M., Nieddu E., Salvatoretti E., Labella B., Fava L., Vanuzzo M.C., Lisi V., Antonello M., Grimaldi C.I., Zulian C., Del Vecchio C., Plebani M., Padoan A., Cirillo D.M., Brazzale A.R., Tonon G., Toppo S., Dorigatti I., Crisanti A. Neutralising reactivity against SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants by vaccination and infection history. *Genome Med.*, 2022, vol. 14, no. 1: 61. doi: 10.1186/s13073-022-01066-2
16. Li C., Huang J., Yu Y., Wan Z., Chiu M.C., Liu X., Zhang S., Cai J.P., Chu H., Li G., Chan J.F., To K.K., Yang Z., Jiang S., Yuen K.Y., Clevers H., Zhou J. Human airway and nasal organoids reveal escalating replicative fitness of SARS-CoV-2 emerging variants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2023, vol. 120, no. 17: e2300376120. doi: 10.1073/pnas.2300376120
17. Lineage List. URL: https://cov-lineages.org/lineage_list.html
18. Liu S., Liang Z., Nie J., Gao W.B., Li X., Zhang L., Yu Y., Wang Y., Huang W. Sera from breakthrough infections with SARS-CoV-2 BA.5 or BF.7 showed lower neutralization activity against XBB.1.5 and CH.1.1. *Emerg. Microbes Infect.*, 2023, vol. 12, no. 2: 2225638. doi: 10.1080/22221751.2023.2225638
19. Planas D., Saunders N., Maes P., Guivel-Benhassine F., Planchais C., Buchrieser J., Bolland W.H., Porrot F., Staropoli I., Lemoine F., P  r   H., Veyer D., Puech J., Rodary J., Baele G., Dellicour S., Raymenants J., Gorissen S., Geenen C., Vanmechelen B., Wawina-Bokalanga T., Martí-Carreras J., Cuypers L., S  ve A., Hocqueloux L., Prazuck T., Rey F.A., Simon-Lori  re E., Bruel T., Mouquet H., André E., Schwartz O. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*, 2022, vol. 602, no. 7898, pp. 671–675. doi: 10.1038/s41586-021-04389-z
20. Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Siniavin A.E., Dolzhikova I.V., Shidlovskaya E.V., Shpakova O.G., Vasilchenko L.A., Glavatskaya A.A., Kuznetsova N.A., Iliukhina A.A., Shelkov A.Y., Grinkevich O.M., Komarov A.G., Logunov D.Y., Gushchin V.A., Gintsburg A.L. In vitro efficacy of antivirals and monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 Omicron lineages XBB.1.9.1, XBB.1.9.3, XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.2.4, BQ.1.1.45, CH.1.1, and CL.1. *Vaccines (Basel)*, 2023, vol. 11, no. 10: 1533. doi: 10.3390/vaccines11101533
21. Qu P., Evans J.P., Faraone J.N., Zheng Y.M., Carlin C., Anghelina M., Stevens P., Fernandez S., Jones D., Lozanski G., Panchal A., Saif L.J., Oltz E.M., Xu K., Gumina R.J., Liu S.L. Enhanced neutralization resistance of SARS-CoV-2 Omicron subvariants BQ.1, BQ.1.1, BA.4.6, BF.7, and BA.2.75.2. *Cell. Host. Microbe*, 2023, vol. 31, no. 1, pp. 9–17.e3. doi: 10.1016/j.chom.2022.11.012
22. Qu P., Faraone J.N., Evans J.P., Zheng Y.M., Carlin C., Anghelina M., Stevens P., Fernandez S., Jones D., Panchal A.R., Saif L.J., Oltz E.M., Zhang B., Zhou T., Xu K., Gumina R.J., Liu S.L. Enhanced evasion of neutralizing antibody response by Omicron XBB.1.5, CH.1.1, and CA.3.1 variants. *Cell. Rep.*, 2023, vol. 42, no. 5: 112443. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112443
23. Roy A., Saade C., Josset L., Clément B., Morfin F., Destras G., Valette M., Icard V., Billaud G., Oblette A., Debombourg M., Garrigou C., Brengel-Pesce K., Generenaz L., Saker K., Hernu R., Pozzetto B., Lina B., Traubaud M.A., Trouillet-Assant S., Bal A. Determinants of protection against SARS-CoV-2 Omicron B.A.1 and Delta infections in fully vaccinated outpatients. *J. Med. Virol.*, 2023, vol. 95, no. 8: e28984. doi: 10.1002/jmv.28984
24. Saito A., Tamura T., Zahradnik J., Deguchi S., Tabata K., Anraku Y., Kimura I., Ito J., Yamasoba D., Nasser H., Toyoda M., Nagata K., Uriu K., Kosugi Y., Fujita S., Shofa M., Monira Begum M., Shimizu R., Oda Y., Suzuki R., Ito H., Nao N., Wang L., Tsuda M., Yoshimatsu K., Kuramochi J., Kita S., Sasaki-Tabata K., Fukuhara H., Maenaka K., Yamamoto Y., Nagamoto T., Asakura H., Nagashima M., Sadamasu K., Yoshimura K., Ueno T., Schreiber G., Takaori-Kondo A., Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Shirakawa K., Sawa H., Irie T., Hashiguchi T., Takayama K., Matsuno K., Tanaka S., Ikeda T., Fukuhara T., Sato K., Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron B.A.2.75 variant. *Cell. Host. Microbe*, 2022, vol. 30, no. 11, pp. 1540–1555.e15. doi: 10.1016/j.chom.2022.10.003
25. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. URL: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html#anchor_1633452601085

26. Tian D., Sun Y., Xu H., Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J. Med. Virol.*, 2022, vol. 94, no. 6, pp. 2376–2383. doi: 10.1002/jmv.27643
27. Uraki R., Ito M., Furusawa Y., Yamayoshi S., Iwatsuki-Horimoto K., Adachi E., Saito M., Koga M., Tsutsumi T., Yamamoto S., Otani A., Kiso M., Sakai-Tagawa Y., Ueki H., Yotsuyanagi H., Imai M., Kawaoka Y. Humoral immune evasion of the omicron subvariants BQ.1.1 and XBB. *Lancet Infect. Dis.*, 2023, vol. 23, no. 1, pp. 30–32. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00816-7
28. Wang Q., Iketani S., Li Z., Liu L., Guo Y., Huang Y., Bowen A.D., Liu M., Wang M., Yu J., Valdez R., Luring A.S., Sheng Z., Wang H.H., Gordon A., Liu L., Ho D.D. Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. *Cell*, 2023, vol. 186, no. 2, pp. 279–286.e8. doi: 10.1016/j.cell.2022.12.018
29. Wang Q., Iketani S., Li Z., Guo Y., Yeh A.Y., Liu M., Yu J., Sheng Z., Huang Y., Liu L., Ho D.D. Antigenic characterization of the SARS-CoV-2 Omicron subvariant BA.2.75. *Cell. Host. Microbe.*, 2022, vol. 30, no. 11, pp. 1512–1517.e4. doi: 10.1016/j.chom.2022.09.002

Авторы:

Зайковская А.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Евseenko В.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Олкин С.Е., ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Пьянков О.В., к.б.н., зав. отделом «Коллекция микроорганизмов» ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Authors:

Zaykovskaya A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Microorganisms Collection Department, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Evseenko V.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Zoonotic Infections and Influenza, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Olkin S.E., Leading Researcher, Department of Biophysics and Environmental Studies, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Pyankov O.V., PhD (Biology), Head of the Microorganisms Collection Department, State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Е.В. Кузьмич¹, И.Е. Павлова¹, Т.В. Глазанова¹, Е.Р. Шилова¹, Л.Н. Бубнова^{1,2}

¹ ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Введение.* Роль HLA-комплекса в иммунном контроле над SARS-CoV-2, невосприимчивости к инфицированию вирусом, характере индивидуального иммунного ответа определяется необычайной вариабельностью HLA-генотипов и вовлеченностью HLA-молекул в механизмы как клеточного, так и гуморального иммунитета. Целью нашей работы являлось выявление HLA-генетических факторов, обуславливающих тяжелое течение COVID-19 у жителей Санкт-Петербурга. *Материалы и методы.* В исследование включены 78 петербуржцев в возрасте от 20 до 84 лет (медиана — 55 лет), перенесших COVID-19 в период 2020–2022 гг. Распределение обследованных лиц по степени тяжести течения COVID-19: легкая — 41, средняя — 32, тяжелая — 5 человек. Для дальнейшего анализа лица со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания были объединены в одну группу (37 человек). Контрольную группу составили 1563 петербуржца, являющихся потенциальными донорами гемопоэтических стволовых клеток, в возрасте от 18 до 60 лет (медиана — 32 года). HLA-типирование базового уровня разрешения выполнено методом полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных праймеров и сиквенс-специфичных олигонуклеотидных проб. Иммуногенетическое обследование представителей контрольной группы выполнено до начала пандемии SARS-CoV-2. *Результаты.* У лиц, перенесших COVID-19 в легкой форме, установлено снижение частоты HLA-A*01 по сравнению с группой со среднетяжелым/тяжелым течением заболевания (0,0366 против 0,1351; $p = 0,04$) и контрольной группой (0,0366 против 0,1193; $p = 0,02$). Выявлена более высокая частота HLA-A*11 у лиц со среднетяжелым/тяжелым течением по сравнению с индивидуумами с легким течением COVID-19 (0,1081 против 0,0244; $p = 0,048$). Отмечалась тенденция к более высокой частоте HLA-A*11 у лиц со среднетяжелым/тяжелым течением по сравнению с группой контроля (0,1081 против 0,0582; $p = 0,08$). Согласно данным многофакторного анализа, риск тяжелого течения COVID-19 у жителей Санкт-Петербурга ассоциирован с наличием группы аллелей HLA-A*11 (ОШ 7,38; ДИ 1,15–47,3; $p = 0,032$) и возрастом (ОШ 1,05; ДИ 1,01–1,09; $p = 0,008$). Также имела место тенденция влияния группы аллелей HLA-A*01 на риск развития тяжелых форм COVID-19 (ОШ 3,88; ДИ 0,88–17,09; $p = 0,068$). *Заключение.* Установлены HLA-маркеры тяжелого течения COVID-19, характерные для жителей Санкт-Петербурга. Учитывая чрезвычайный аллельный полиморфизм HLA-генов, исследования, включающие представителей различных популяций, необходимы для более глубокого понимания роли HLA системы в исходах COVID-19 и разработки эффективных вакцин.

Ключевые слова: иммуногенетические маркеры, тяжесть заболевания, COVID-19, HLA-аллели, HLA-гены, SARS-CoV-2.

Адрес для переписки:

Кузьмич Елена Витальевна
191024, Россия, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16,
ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии
ФМБА России.
Тел.: 8 921 912-52-07.
E-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Contacts:

Elena V. Kuzmich
191024, Russian Federation, St. Petersburg, 2nd Sovietskaya str., 16,
Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology.
Phone: +7 921 912-52-07.
E-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Для цитирования:

Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Глазанова Т.В., Шилова Е.Р., Бубнова Л.Н.
Иммуногенетические маркеры тяжести течения COVID-19 у жителей
Санкт-Петербурга // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 891–
899. doi: 10.15789/2220-7619-IMO-17640

Citation:

Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Glazanova T.V., Shilova E.R., Bubnova L.N.
Immunogenetic markers of COVID-19 severity in St. Petersburg residents //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024,
vol. 14, no. 5, pp. 891–899. doi: 10.15789/2220-7619-IMO-17640

IMMUNOGENETIC MARKERS OF COVID-19 SEVERITY IN ST. PETERSBURG RESIDENTSKuzmich E.V.^a, Pavlova I.E.^a, Glazanova T.V.^a, Shilova E.R.^a, Bubnova L.N.^{a,b}^a Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation^b Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Background. The role for the HLA complex in SARS-CoV-2 immunosurveillance, resistance to virus infection and type of the individual immune response is accounted for by the extraordinary variability of HLA-genotypes as well as involvement of HLA-molecules in the mechanisms behind both cellular and humoral immunity. The aim of our study was to identify HLA-genetic factors underlying severe COVID-19 course in St. Petersburg residents. **Materials and methods.** The study included 78 St. Petersburg residents aged 20 to 84 years (median — 55 years) recovered after COVID-19 in 2020–2022. The distribution of the examined persons based on COVID-19 severity was as follows: mild — 41, moderate — 32, severe — 5 persons. For further analysis, subjects with moderate-to-severe disease were included into a single group (37 persons). The control group consisted of 1.563 St. Petersburg residents who were potential hematopoietic stem cell donors, aged 18 to 60 years (median — 32 years). The low resolution HLA typing was performed by polymerase chain reaction using sequence-specific primers and sequence-specific oligonucleotide probes. HLA typing in control group was performed prior to SARS-CoV-2 pandemic. **Results.** A lower frequency of HLA-A*01 group was found in individuals with mild vs moderate/severe COVID-19 (0.0366 vs 0.1351; $p = 0.04$) and control group (0.0366 vs 0.1193; $p = 0.02$). A higher frequency of HLA-A*11 group was found in moderate/severe course compared to mild COVID-19 (0.1081 vs 0.0244; $p = 0.048$). Compared to control group, HLA-A*11 frequency in moderate/severe course (0.1081 vs 0.0582; $p = 0.08$) tended to increase. According to multivariate analysis, the risk of severe COVID-19 course in St. Petersburg residents was significantly associated with detected HLA-A*11 allele group (OR 7.38; CI 1.15–47.3; $p = 0.032$) and age (OR 1.05; CI 1.01–1.09; $p = 0.008$) along with an effect from HLA-A*01 tending to contribute to a risk of developing severe COVID-19 (OR 3.88; CI 0.88–17.09; $p = 0.068$). **Conclusion.** HLA markers for severe COVID-19 in St. Petersburg residents was identified providing deeper insight into a role played by HLA system in COVID-19 outcomes.

Key words: immunogenetic markers, disease severity, COVID-19, HLA-alleles, HLA-genes, SARS-CoV-2.

Введение

HLA-комплекс, являющийся одной из наиболее сложных и полиморфных генетических систем, обеспечивает иммунологическую толерантность и выживание человечества в условиях воздействия разнообразных, обладающих высоким мутационным потенциалом патогенов. Необходимость существования сложных защитных иммунных механизмов демонстрирует взаимодействие человечества с вирусами семейства *Coronaviridae* (Коронавирусы). Коронавирусы, относящиеся к РНК-содержащим вирусам, до 2002 г. рассматривались в качестве инфекционных агентов, вызывающих у человека нетяжелые заболевания верхних дыхательных путей с крайне редкими летальными исходами [3]. В 2002 г. вирус SARS-CoV из рода *Betacoronavirus* впервые стал причиной эпидемии атипичной пневмонии (тяжелого острого респираторного синдрома, Severe Acute Respiratory Syndrome — SARS) в результате которой погибли 774 человек из 37 стран мира. В 2004 г. на Аравийском полуострове вспыхнула эпидемия β -коронавируса MERS-CoV. До 2020 г. от MERS (Ближневосточный респираторный синдром, Middle East respiratory syndrome) погибли 866 человек [3]. Вспышка заболевания, вызванная β -коронавирусом SARS-CoV-2, зарегистрированная в декабре 2019 г. в городе Ухань

Китайской Народной Республики, к марту 2021 г. приняла форму пандемии, согласно официальному заключению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). По данным ВОЗ, общее число смертей в 2020–2021 гг., прямо или косвенно связанных с пандемией COVID-19, составило примерно 15 млн человек [4].

Роль HLA-комплекса в иммунном контроле над SARS-CoV-2, невосприимчивости к инфицированию вирусом, характере индивидуального иммунного ответа определяется необычайной вариабельностью HLA-генотипов и вовлеченностью HLA-молекул в механизмы как клеточного, так и гуморального иммунитета. В связи с появлением новых штаммов и быстро развивающимся уклонением от иммунного надзора посредством белков SARS-CoV-2, изучение HLA-опосредованного иммунитета при COVID-19 критически важно, но еще далеко от полного понимания [7].

Целью нашей работы являлось выявление HLA-генетических факторов, обуславливающих тяжелое течение COVID-19 у жителей Санкт-Петербурга.

Материалы и методы

В исследование включены жители Санкт-Петербурга. В составе группы лиц, перенесших COVID-19 в период 2020–2022 гг., 78 че-

людей в возрасте от 20 до 84 лет (медиана — 55 лет), 58 женщин (74,4%) и 20 мужчин (25,6%). Распределение пациентов в зависимости от варианта SARS-CoV-2: исходный (Уханьский) — 40, Дельта — 29, Омикрон — 9 случаев. Варианты SARS-CoV-2 определены на основе данных мониторинга заболеваемости вирусной инфекцией и циркулирующих генетических вариантов, осуществляемого в г. Санкт-Петербурге согласно рекомендациям ВОЗ [11]. Распределение обследованных лиц по степени тяжести течения COVID-19 в соответствии с Временными методическими рекомендациями Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия 18 от 26.10.2023: легкая — 41, средняя — 32, тяжелая — 5 человек. Для дальнейшего анализа лица со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания были объединены в одну группу (37 человек). Контрольную группу составили 1563 индивидуума, являющихся потенциальными донорами гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), в возрасте от 18 до 60 лет (медиана — 32 года), 808 женщин (51,7%) и 755 мужчин (48,3%).

Иммуногенетическое обследование (HLA-типирование генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 базового уровня разрешения) выполнено методом полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных праймеров (реагенты производства «Protrans», Германия) и сиквенс-специфичных олигонуклеотидных проб (реагенты производства «BAG HEALTH CARE», Германия). Иммуногенетическое обследование представителей контрольной группы выполнено до начала пандемии SARS-CoV-2.

Обработка результатов иммуногенетических исследований осуществлена методами популяционной генетики с использованием программы Arlequin, версия 3.5.1.2 [5]. Статистический анализ выполнен с помощью программы STATISTICA 10. Для сравнения частот групп HLA-аллелей использован двухсторонний точный критерий Фишера. При проведении многофакторного анализа применен метод пошаговой логистической регрессии. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Группы аллелей генов HLA класса I. У лиц, перенесших COVID-19 в легкой форме, установлено снижение частоты группы HLA-A*01 по сравнению с группой со среднетяжелым/тяжелым течением заболевания (0,0366 против 0,1351; $p = 0,04$) и контрольной группой (0,0366

против 0,1193; $p = 0,02$). Выявлена более высокая частота группы HLA-A*11 у лиц со среднетяжелым/тяжелым течением по сравнению с индивидуумами с легким течением COVID-19 (0,1081 против 0,0244; $p = 0,048$). Также отмечалась тенденция к более высокой частоте HLA-A*11 у лиц со среднетяжелым/тяжелым течением по сравнению с группой контроля (0,1081 против 0,0582; $p = 0,08$). Группа HLA-A*03 достоверно чаще определялась у лиц с легким течением COVID-19 по сравнению с контрольной группой (0,2317 против 0,1481; $p = 0,04$). Различия, выявленные при сравнении групп с легким и среднетяжелым/тяжелым течением, не являлись статистически достоверными (0,2317 против 0,1315; $p = 0,15$). Частоты групп аллелей гена HLA-A представлены в табл. 1.

У петербуржцев, перенесших COVID-19 в легкой форме, установлено снижение частоты HLA-B*18 по сравнению с контрольной группой (0,0122 против 0,0736; $p = 0,03$); при сравнении с группой со среднетяжелым/тяжелым течением достоверные различия не выявлены (0,0122 против 0,0541; $p = 0,19$). Частоты групп аллелей гена HLA-B представлены в табл. 2.

Частота HLA-C*03 у лиц с легким течением заболевания была достоверно выше, чем у представителей контрольной группы (0,1950 против 0,1104; $p = 0,03$); при сравнении с группой со среднетяжелым/тяжелым течением статистически достоверные различия не установлены (0,1950 против 0,1216; $p = 0,28$). Частоты групп аллелей гена HLA-C представлены в табл. 3.

Группы аллелей генов HLA класса II. Статистически достоверные различия частот групп аллелей гена HLA-DRB1 в сравниваемых группах не выявлены (табл. 4).

В группах сравнения также не установлены различия частот групп аллелей гена HLA-DQB1 (табл. 5).

Многофакторный анализ. Закономерности, установленные в результате однофакторного анализа, были проверены с помощью статистических методов, позволяющих оценить комплексное воздействие различных факторов на изучаемый показатель. При выполнении многофакторного анализа учитывались следующие параметры: возраст (линейно), пол, вариант SARS-CoV-2 и иммуногенетические факторы (наличие конкретных групп HLA-аллелей). Установлено, что риск тяжелого течения COVID-19 у жителей Санкт-Петербурга ассоциирован с наличием HLA-A*11 (отношение шансов — ОШ 7,38; доверительный интервал — ДИ 1,15–47,3; $p = 0,032$) и возрастом (ОШ 1,05; ДИ 1,01–1,09; $p = 0,008$). Также отмечалась тенденция влияния HLA-A*01 на риск развития тяжелого течения заболевания (ОШ 3,88; ДИ 0,88–17,09; $p = 0,068$).

Таблица 1. Частоты групп аллелей гена HLA-A

Table 1. HLA-A allele group frequencies

Группа аллелей HLA-A allele groups	Частоты групп аллелей/HLA-A allele group frequencies			P _{1,3}	P _{2,3}	P _{1,2}
	Легкое течение COVID-19 (1) Mild COVID-19 (1)	Среднетяжелое/тяжелое течение COVID-19 (2) Moderate/severe COVID-19 (2)	Контрольная группа (3) Control group (3)			
01	0,0366	0,1351	0,1193	0,02	0,72	0,04
02	0,3415	0,2162	0,3183	0,63	0,08	0,11
03	0,2317	0,1351	0,1481	0,04	0,87	0,15
11	0,0244	0,1081	0,0582	0,33	0,08	0,048
23	0,0122	0,0135	0,0198	1	1	1
24	0,0732	0,1351	0,1068	0,47	0,45	0,29
25	0,0488	0,0541	0,0416	0,78	0,55	1
26	0,0488	0,0541	0,0403	0,57	0,54	1
29	0,0122	0,0270	0,0106	0,59	0,19	0,60
30	0,0366	0	0,0192	0,22	–	–
31	0,0366	0,0405	0,0221	0,43	0,23	1
32	0,0122	0,0135	0,0272	0,73	0,72	1
33	0,0366	0,0135	0,0208	0,25	1	0,62
34	0	0	0,0003	–	–	–
36	0	0	0,0006	–	–	–
66	0	0,0135	0,0067	–	0,40	–
68	0,0488	0,0405	0,0387	0,56	0,76	1
69	0	0	0,0006	–	–	–
74	0	0	0,0006	–	–	–

Примечание. «–» — расчет уровня статистической значимости (p) не проводился в связи с отсутствием HLA-маркера в одной из сравниваемых групп.
Note. “–” — significance (p) level was not carried out due to the lack of HLA-marker in one of the compared groups.

Таблица 2. Частоты групп аллелей гена HLA-B

Table 2. HLA-B allele group frequencies

Группа аллелей HLA-B allele groups	Частоты групп аллелей/HLA-B allele group frequencies			P _{1,3}	P _{2,3}	P _{1,2}
	Легкое течение COVID-19 (1) Mild course of COVID-19 (1)	Среднетяжелое/тяжелое течение COVID-19 (2) Moderate/severe COVID-19 (2)	Контрольная группа (3) Control group (3)			
07	0,1707	0,1892	0,1296	0,32	0,16	0,84
08	0,0366	0,0405	0,0611	0,48	0,62	1
13	0,0732	0,0405	0,0601	0,63	0,62	0,5
14	0,0366	0,0270	0,0253	0,47	0,71	1
15	0,0610	0,0676	0,0723	1	1	1
18	0,0122	0,0541	0,0736	0,03	0,66	0,19
27	0,0610	0,0270	0,0483	0,6	0,58	0,45
35	0,0976	0,1351	0,1177	0,73	0,59	0,62
37	0	0	0,0131	–	–	–
38	0,0732	0,0541	0,0365	0,13	0,35	0,75
39	0,0244	0	0,0237	–	0,72	–
40	0,0976	0,0811	0,0537	0,09	0,29	0,78
41	0,0122	0,0270	0,0256	0,72	0,71	0,6
44	0,1098	0,0676	0,1027	0,85	0,44	0,41
45	0	0	0,0016	–	–	–
46	0	0	0,0006	–	–	–
47	0,0122	0	0,0016	0,14	–	–
48	0	0	0,0054	–	–	–
49	0	0,0135	0,0122	–	0,6	–
50	0,0244	0	0,0090	0,18	–	–
51	0,0366	0,0541	0,0534	0,8	1	0,71
52	0,0122	0,0541	0,0186	1	0,054	0,19
53	0	0,0135	0,0010	–	0,09	–
54	0	0	0,0003	–	–	–
55	0	0	0,0070	–	–	–
56	0,0244	0,0135	0,0096	0,2	0,52	1
57	0	0,0405	0,0272	–	0,46	–
58	0,0244	0	0,0090	0,18	–	–
73	0	0	0,0030	–	–	–

Таблица 3. Частоты групп аллелей гена HLA-C

Table 3. HLA-C allele group frequencies

Группа аллелей HLA-C HLA-C allele groups	Частоты групп аллелей HLA-C allele group frequencies			P _{1,3}	P _{2,3}	P _{1,2}
	Легкое течение COVID-19 (1) Mild COVID-19 (1)	Среднетяжелое/тяжелое течение COVID-19 (2) Moderate/severe COVID-19 (2)	Контрольная группа (3) Control group (3)			
01	0,0122	0,0270	0,0365	0,37	1	0,60
02	0,0488	0,0541	0,0640	0,82	1	1
03	0,1950	0,1216	0,1104	0,03	0,71	0,28
04	0,1585	0,1621	0,1344	0,51	0,49	1
05	0,0122	0,0270	0,0425	0,26	0,77	0,60
06	0,0976	0,0676	0,1171	0,73	0,27	0,57
07	0,2561	0,2838	0,2754	0,80	0,90	0,72
08	0,0366	0,0405	0,0301	0,74	0,49	1
12	0,1463	0,1351	0,1184	0,39	0,59	1
14	0	0	0,0093	–	–	–
15	0,0366	0,0541	0,0240	0,45	0,11	0,71
16	0	0,0270	0,0132	–	0,26	–
17	0	0	0,0246	–	–	–
18	0	0	0,0003	–	–	–

Таблица 4. Частоты групп аллелей гена HLA-DRB1

Table 4. HLA-DRB1 allele group frequencies

Группа аллелей HLA-DRB1 allele groups	Частоты групп аллелей HLA-DRB1 allele group frequencies			P _{1,3}	P _{2,3}	P _{1,2}
	Легкое течение COVID-19 (1) Mild COVID-19 (1)	Среднетяжелое/тяжелое течение COVID-19 (2) Moderate/severe COVID-19 (2)	Контрольная группа (3) Control group (3)			
01	0,1220	0,1622	0,1296	1	0,38	0,5
03	0,0366	0,0405	0,0749	0,28	0,37	1
04	0,1463	0,1757	0,1132	0,38	0,1	0,67
07	0,1463	0,1351	0,1366	0,75	1	1
08	0,0122	0,0405	0,0397	0,38	0,77	0,35
09	0	0	0,0128	–	–	–
10	0,0122	0	0,0083	0,5	–	–
11	0,1220	0,0946	0,1264	1	0,59	0,62
12	0,0122	0,0135	0,0266	0,72	1	1
13	0,1463	0,1216	0,1257	0,61	1	0,81
14	0	0	0,0186	–	–	–
15	0,1707	0,1892	0,1449	0,52	0,32	0,84
16	0,0732	0,0270	0,0429	0,17	0,77	0,28

Таблица 5. Частоты групп аллелей гена HLA-DQB1

Table 5. HLA-DQB1 allele group frequencies

Группа аллелей HLA-DQB1 allele groups	Частоты групп аллелей HLA-DQB1 allele group frequencies			P _{1,3}	P _{2,3}	P _{1,2}
	Легкое течение COVID-19 (1) Mild COVID-19 (1)	Среднетяжелое/тяжелое течение COVID-19 (2) Moderate/severe COVID-19 (2)	Контрольная группа (3) Control group (3)			
02	0,1584	0,1351	0,1811	0,67	0,36	0,82
03	0,3659	0,3243	0,3493	0,81	0,71	0,62
04	0,0244	0,0405	0,0368	0,77	0,75	0,67
05	0,2073	0,2027	0,2038	0,89	1	1
06	0,2439	0,2973	0,2290	0,79	0,16	0,47

Обсуждение

Влияние возраста пациента на характер течения COVID-19, отмеченное в процессе нашего исследования, соответствует ранее опубликованным данным [9, 12, 13]. Известно, что пожилой возраст является фактором риска не только при COVID-19, но и при других вирусных инфекциях, включая MERS-CoV и SARS-CoV. Причинами тяжелого течения вирусных инфекций у пожилых людей могут быть не только возрастные хронические заболевания, но и снижение эффективности иммунной системы, наблюдающееся по мере старения [2].

Однако тяжелые формы COVID-19 встречаются у молодых пациентов без хронических заболеваний и у детей, что свидетельствует о влиянии других факторов, связанных, вероятно, не только с инфекционным агентом, но и с организмом человека. Со стороны инфекционного агента степень тяжести можно объяснить его вирулентностью и вирусной нагрузкой. Со стороны пациента характер течения заболевания обуславливается реакцией иммунной системы и прежде всего механизмами адаптивного ответа, предопределенного иммуногенетическими факторами.

После проникновения в клетку вирус SARS-CoV-2 немедленно индуцирует трансляцию собственных белков. Некоторые из продуцированных белков вируса попадают в протеасомы инфицированной клетки и расщепляются до пептидов, которые могут связываться соответствующими молекулами HLA класса I. Образовавшийся комплекс может вступать во взаимодействие с рецептором CD8⁺ Т-лимфоцитов, что приводит к активации и делению Т-лимфоцитов. В течении 5–7 дней образуется популяция вирусспецифических цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, способных уничтожать инфицированные клетки посредством перфоринов и сериновых протеаз [22]. Таким образом, молекулы HLA класса I являются ключевыми медиаторами первого звена в развитии специфического иммунного ответа на инфекцию, вызванную SARS-CoV-2.

Выполненное нами исследование позволило установить, что наличие группы аллелей HLA-A*11 ассоциировано с тяжелым течением COVID-19 у жителей Санкт-Петербурга. Установленная закономерность получила подтверждение в ходе многофакторного анализа, включавшего, помимо иммуногенетических параметров, вариант SARS-CoV-2, возраст и пол пациента. Наличие группы HLA-A*01 также коррелировало с риском более тяжелого течения заболевания согласно результатам однофакторного анализа. По данным многофакторного анализа наблюдалась тенденция к повышению риска тяжелых форм COVID-19 у пациентов, имеющих группу HLA-A*01.

Следует отметить, что негативное влияние группы HLA-A*11 на характер течения COVID-19 установлено учеными различных стран. В частности, отмечена более высокая смертность от COVID-19 у жителей Канарских островов с наличием HLA-A*11. Помимо HLA-A*11 к факторам негативного прогноза были отнесены также группы HLA-C*01 и HLA-DQB1*04 [14]. Согласно заключению Wang F. и коллег, аллель HLA-A*11:01 наряду с HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02 предрасполагали к худшему исходу заболевания у представителей китайской популяции [21]. Наличие аллеля HLA-A*11:01:01:01, а также гаплотипа HLA-C*12:02:02:01-HLA-B*52:01:01:02 ассоциировалось с тяжелым течением COVID-19 у жителей Японии [13]. Следует обратить внимание, что ранее была отмечена взаимосвязь группы аллелей HLA-A*11 с восприимчивостью человека к вирусу гриппа А (H1N1) [10].

В литературных источниках также представлены данные, подтверждающие влияние аллелей из группы HLA-A*01 на характер течения новой коронавирусной инфекции. Шкурников М.Ю. и соавт. сообщили об ассоциации аллеля HLA-A*01:01 с высоким риском развития тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного SARS-CoV-2. Наличие аллелей HLA-A*02:01 и HLA-A*03:01, напротив, коррелировало с низким риском критического течения COVID-19. Ученые также установили, что гомозиготность по HLA-A*01:01 была ассоциирована с ранней смертью, в то время как гомозиготность по HLA-A*02:01 имела место только у одного пациента до 60 лет, погибшего от COVID-19 [19]. Данные, полученным нами ранее, свидетельствовали, что наличие группы аллелей A*02 также снижает вероятность заболевания новой коронавирусной инфекцией [1].

Анализ исходов COVID-19 у представителей болгарской популяции позволил установить, что HLA-A*01:01 выражено коррелируют с прогрессированием заболевания и может рассматриваться в качестве аллеля высокого риска. К негативным прогностическим маркерам помимо HLA-A*01:01 были отнесены также: HLA-B*35:03, HLA-B*40:06 и HLA-DRB1*14:01. Аллели HLA-A*23:01 и HLA-DQB1*05:03 были ассоциированы со среднетяжелым течением COVID-19. Аллели HLA-A*02:01 и HLA-DQB1*03:01 встречались преимущественно у бессимптомных пациентов и в контрольной группе, что свидетельствовало об их вероятном защитном эффекте [15].

Как известно, молекулы HLA класса I являются лигандами иммуноглобулинподобных рецепторов киллерных клеток (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR), участвующих в регуляции функциональной активности натуральных киллеров (NK-клетки). NK-

клетки играют важную роль в противовирусном контроле благодаря уникальной способности лизировать клетки-мишени без предварительной иммунизации. Закономерности, установленные исследователями из Объединенных Арабских Эмиратов, свидетельствующие о корреляции между тяжелым течением COVID-19 и наличием групп HLA-C*04, HLA-B*35, а также гаплотипа HLA-C*04-B*35, вероятно, объясняются взаимосвязью этих групп HLA-аллелей с механизмами врожденного иммунитета, реализуемого NK-клетками [20].

Выраженная ассоциация тяжелой формы COVID-19 и аллеля HLA-C*04:01 установлена при обследовании нескольких европеоидных популяций. Согласно заключению армянских ученых, наличие аллеля HLA-C*04:01 оказывает влияние на процессинг антигена и презентацию эндогенного пептидного антигена молекулами HLA класса I посредством эндоплазматического ретикулума, NK-опосредованную цитотоксичность и врожденный иммунный ответ на чужеродные агенты [17].

Важную роль в иммунном ответе на SARS-CoV-2 также играют молекулы HLA класса II благодаря своей способности связывать вирусные антигенные детерминанты и представлять для распознавания CD4⁺ Т-хелперами, что является ключевым событием в активации В-лимфоцитов. Клональная экспансия В-лимфоцитов, их дифференцировка в плазматические приводит к выработке антител, направленных против презентируемых вирусных пептидов. Антитела против рецептор-связывающего домена шипов SARS-CoV-2 — Spike Protein S1 препятствуют прикреплению вируса к клеткам эпителия альвеол и, таким образом, являются «нейтрализующими иммуноглобулинами». Антитела, направленные против протеина нуклеокапсида SARS-CoV-2 — Nucleocapsid, не способны связываться со свободной вирусной частицей. Однако такие антитела могут фиксироваться комплексом «фрагмент антигена Nucleocapsid + HLA класс I» клеток эпителия и активировать систему комплемента, вызывая образование мембран-атакующего комплекса с последующим лизисом инфицированной клетки и усилением воспаления. Поражение значительного количества альвеолоцитов и интенсивная воспалительная реакция обуславливают развитие тяжелого острого респираторного синдрома. Скорость и качество образующихся антител определяются способностью фрагментов вирусных протеинов конкурентно связываться с молекулами HLA классов I и II, что зависит прежде всего от свойств HLA молекул [22].

Заключения ряда исследований, выполненных к настоящему времени, позволяют выделить HLA класс II генетические факторы, наиболее

значимые для прогноза течения COVID-19. В частности, согласно данным российских ученых, к негативным прогностическим факторам развития тяжелых форм COVID-19 и повышения летальности помимо возраста пациента относятся аллели HLA-DRB1*01:01:01G, HLA-DRB1*01:02:01G и HLA-DQB1*05:03:01G, а также гаплотип HLA-B*14:02:01G-C*08:02:01G [9].

Astbury S. и соавт. в результате обследования группы медицинских работников установили, что наличие аллеля HLA-DRB1*13:02 было связано с многократным увеличением риска клинических проявлений COVID-19. С точки зрения иммунной реактивности, аллель HLA-DRB1*15:02 ассоциировался с более низкими Т-клеточными ответами против пула нуклеопротеиновых пептидов SARS-CoV-2. Наличие аллеля HLA-DRB1*15:01 коррелировало с повышенными «спайковыми» Т-клеточными ответами как после первой, так и после второй дозы вакцинации [6].

Как демонстрирует клинический опыт, по меньшей мере 20% людей, инфицированных SARS-CoV-2, не имеют клинических проявлений заболевания [18]. Изучение бессимптомной инфекции предоставило уникальную возможность рассмотреть иммунологические особенности, способствующие быстрому выведению вируса. Augusto D.G. и соавт. выявили ассоциацию HLA-B*15:01 с асимптоматическим течением COVID-19. Ученые показали, что Т-клетки из допандемических образцов от лиц, несущих HLA-B*15:01, реактивны по отношению к иммунодоминантному пептиду NQKLIANQF, производному из шипа SARS-CoV-2. Большинство реактивных Т-клеток, демонстрировавших фенотип памяти, были высоко полифункциональными и перекрестно реагировали с пептидами, полученными из сезонных коронавирусов. Кристаллическая структура комплексов HLA-B*15:01-пептид демонстрирует, что пептиды NQKLIANQF и NQKLIANAF (из вирусов OC43-CoV и HKU1-CoV) обладают сходной способностью стабилизироваться и представляться HLA-B*15:01. Таким образом, структурное сходство пептидов лежит в основе перекрестной реактивности Т-клеток с высокоаффинными общими Т-клеточными рецепторами, обеспечивая молекулярную основу для HLA-B*15:01-опосредованного предсуществующего иммунитета против SARS-CoV-2 [8].

Mentzer A.J. и соавт. показали, что носители группы аллелей HLA-DQB1*06 имеют более выраженный антительный ответ против спайкового белка SARS-CoV-2 и рецептора связывающего домена при применении таких вакцин, как ChAdOx1, nCoV-19, BNT162b2. Наличие HLA-DQB1*06 также ассоциировалось со снижением риска прорывной инфекции после первой дозы

вакцины. Ученые идентифицировали пептид, производный из шипа SARS-CoV-2, который, как предполагается, специфически связывается с HLA-DQB1*06, что приводит к улучшению пролиферации CD4⁺ Т-клеток и активации В-клеток памяти [16].

В заключение следует отметить, что многочисленные исследования, выполненные в течение двух лет глобальной пандемии, позволили

сформировать представления о роли HLA-генетических факторов в восприимчивости и чувствительности к SARS-CoV-2. Результаты настоящего исследования также внесли определенный вклад в понимание этих процессов и позволили из множества иммуногенетических маркеров выделить максимально значимые для прогноза тяжелого течения COVID-19 у жителей Санкт-Петербурга.

Список литературы/References

1. Бубнова Л.Н., Павлова И.Е., Беркос А.С., Терентьева М.А., Глазанова Т.В., Ерохина Л.В., Беляева Е.В., Четкин А.В., Башкетова Н.С., Чхинджерия И.Г., Кожемякина М.А., Азаров Д.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Особенности распределения групп аллелей HLA-A*, B*, DRB1* среди лиц, перенесших COVID-19 // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 3. С. 551–560. [Bubnova L.N., Pavlova I.E., Berkos A.S., Terentyeva M.A., Glazanova T.V., Erokhina L.V., Belyaeva E.V., Chechetkin A.V., Bashketova N.S., Chkhindzheria I.G., Kozhemyakina M.A., Azarov D.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Distribution patterns of HLA-A*, B*, DRB1* allele groups among persons who underwent COVID-19. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, vol. 23, no. 3, pp. 551–560. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-DPO-2334
2. Глазанова Т.В., Павлова И.Е., Беляева Е.В., Торшина Ю.С., Шилова Е.Р. Особенности состояния иммунной системы у пациентов после перенесенной инфекции COVID-19 // Вестник гематологии. 2023. Т. XIX, № 2. С. 18–25. [Glazanova T.V., Pavlova I.E., Belyaeva E.V., Torshina Yu.S., Shilova E.R. State of the immune system in patients after a transfer of COVID-19 infection. *Vestnik gematologii = The Bulletin of Hematology*, 2023, vol. XIX, no. 2, pp. 18–25. (In Russ.)]
3. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): методические рекомендации. Версия 18 от 26.10.2023. [Prevention, diagnosis, and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): guidelines. Version 18 of 26.10.2023. (In Russ.)] URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896
4. Adam D. 15 million people have died in the pandemic, WHO says. *Nature*, 2022, vol. 605, no. 7909: 206. doi: 10.1038/d41586-022-01245-6
5. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [cmpg.unibe.ch]. Arlequin ver. 3.5.2.2 [released on 02.08.2015; date of access March 2024]. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>
6. Astbury S., Reynolds C.J., Butler D.K., Muñoz-Sandoval D.C., Lin K.M., Pieper F.P., Otter A., Kouraki A., Cusin L., Nightingale J., Vijay A., Craxford S., Aithal G.P., Tighe P.J., Gibbons J.M., Pade C., Joy G., Maini M., Chain B., Semper A., Brooks T., Ollivier B.J., McKnight Á., Noursadeghi M., Treibel T.A., Manisty C., Moon J.C., Valdes A.M., Rosemary J. Boyton R.J., Altmann D.M. *Immunology*, 2022, vol. 166, pp. 68–77. doi: 10.1111/imm.13450
7. Augusto D.G., Hollenbach J.A. HLA variation and antigen presentation in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection. *Curr. Opin. Immunol.*, 2022, vol. 76:102178. doi: 10.1016/j.coi.2022.102178
8. Augusto D.G., Murdolo L.D., Chatzileontiadou D.S.M., Sabatino J.J.Jr., Yusufali T., Peyser N.D., Butcher X., Kizer K., Guthrie K., Murray V.W., Pae V., Sarvadhavabhatla S., Beltran F., Gill G.S., Lynch K.L., Yun C., Maguire C.T., Peluso M.J., Hoh R., Henrich T.J., Deeks S.G., Davidson M., Lu S., Goldberg S.A., Kelly J.D., Martin J.N., Vierra-Green C.A., Spellman S.R., Langton D.J., Dewar-Oldis M.J., Smith C., Barnard P.J., Lee S., Marcus G.M., Olgin J.E., Pletcher M.J., Maiers M., Gras S., Hollenbach J.A. A common allele of HLA is associated with asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 2023, vol. 620, pp. 128–136. doi: 10.1038/s41586-023-06331-x
9. Cheranev V., Bulusheva I., Vechorko V., Korostin D., Rebrikov D. The Search of Association of HLA Class I and Class II Alleles with COVID-19 Mortality in the Russian Cohort. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24: 3068. doi: 10.3390/ijms24043068
10. Dutta M., Dutta P., Medhi S., Borkakoty B., Biswas D. Polymorphism of HLA class I and class II alleles in influenza A(H1N1) pdm09 virus infected population of Assam, Northeast India. *J. Med. Virol.*, 2018, vol. 90, pp. 854–860. doi: 10.1002/jmv.25018
11. Gladkikh A., Dedkov V., Sharova A., Klyuchnikova E., Sbarzaglia V., Arbuzova T., Forghani M., Ramsay E., Dolgova A., Shabalina A., Tsyganova N., Totolian A. Uninvited guest: arrival and dissemination of omicron lineage SARS-CoV-2 in St. Petersburg, Russia. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 8: 1676. doi: 10.3390/microorganisms10081676
12. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Lui L., Shan H., Lei C.L., Hui D.S.C., Du B., Li L.J., Zeng G., Yuen K.Y., Chen R.C., Tang C.L., Wang T., Chen P.Y., Xiang J., Li S.Y., Wang J.L., Liang Z.J., Peng Y., Wei L., Liu Y., Hu Y.H., Peng P., Wang J.M., Liu J.Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.J., Qiu S., Luo J., Ye C.J., Zhu S.Y., Zhong N.S. *New Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 18, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
13. Khor S.S., Omae Y., Nishida N., Sugiyama M., Kinoshita N., Suzuki T., Suzuki M., Suzuki S., Izumi S., Hojo M., Ohmagari N., Mizokami M., Tokunaga K. HLA-A11:01:01:01, HLA-C12:02:02:01-HLA-B52:01:02:02, age and sex are associated with severity of Japanese COVID-19 with respiratory failure. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 658570. doi: 10.3389/fimmu.2021.658570
14. Lorente L., Martín M.M., Franco A., Barrios Y., Cáceres J.J., J. Solé-Violán, Perez A., Marcos y Ramos J.A., Ramos-Gómez L., Ojeda N., Jiménez A., Working Group on COVID-19 Canary ICU. HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Med. Intensiva*, 2021, vol. 45, no. 2, pp. 96–103. doi: 10.1016/j.medin.2020.08.004
15. Lukanov T., Al Hadra B., Snezhina Kandilarova S., Hristova Z., Proevska Y., Shikova E., Lesichkova I. S., Ivanov N., Georgieva A., Lalova D., Popov T., Svinarov D., Mihaylova A., Naumova E. Role of HLA polymorphism in COVID-19 progression in the Bulgarian population. *HLA*, 2023, vol. 101, pp. 373–374. doi: 10.1111/tan.15000

16. Mentzer A.J., O'Connor D., Bibi S., Chelysheva I., Clutterbuck E.A., Demissie T., Dinesh T., Edwards N.J., Felle S., Feng S., Flaxman A.L., Karp-Tatham E., Li G., Liu X., Marchevsky N., Godfrey L., Makinson R., Bull M.B., Fowler J., Alamad B., Malinauskas T., Chong A.Y., Sanders K., Shaw R.H., Voysey M., Oxford COVID Vaccine Trial Genetics Study Team Group, Snape M.D., Pollard A.J., Lambe T., Knigh J.C. Human leukocyte antigen alleles associate with COVID-19 vaccine immunogenicity and risk of breakthrough infection. *Nat. Med.*, 2023, vol. 29, pp. 147–157. doi: 10.1038/s41591-022-02078-6
17. Nersisyan S., Hovhannisyanyan A., Hyussyan A., Hakobyan S., Avagyan S., Jordan F., Arakelyan A., Mayilyan K. Possible biological mechanisms underlying the association between COVID-19 severity and HLA-C*04:01. *HLA*, 2023, vol. 101: 351. doi: 10.1111/tan.15000
18. Ra S.H., Lim J.S., Kim G.U., Kim M.J., Jung J., Kim S.H. Upper respiratory viral load in asymptomatic individuals and mildly symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection. *Thorax*, 2021, vol. 76, no. 1, pp. 61–63. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215042
19. Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., Galatenko A., Gordeev I., Vechorko V., Tonevitsky A. Association of HLA class I genotypes with severity of Coronavirus disease-19. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 641900. doi: 10.3389/fimmu.2021.641900
20. Tay G.K., Alnaqbi H., Chehadeh S., Peramo B., Mustafa F., Rizvi T.A., Mahbou B.H., Uddin M., Alkaabi N., Alefishat E., Jelinek H.F., Alsafar H. HLA class I associations with the severity of COVID-19 disease in the United Arab Emirates. *PLoS One*, 2023, vol. 18, no. 9: e0285712. doi: 10.1371/journal.pone.0285712
21. Wang F., Huang S., Gao R., Zhou Y., Lai C., Zhichao Li, Xian W., Qian X., Li Z., Huang Y., Tang Q., Liu P., Chen R., Rong Liu, Xuan Li, Tong X., Zhou X., Bai Y., Duan G., Zhang T., Xu X., Wang J., Yang H., Liu S., He Q., Jin X., Liu L. Initial whole-genome sequencing and analysis of the host genetic contribution to COVID-19 severity and susceptibility. *Cell Discov.*, 2020, vol. 6, no. 1: 83. doi: 10.1038/s41421-020-00231-4
22. Wherry E.J., Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, pp. 5535–5545. doi: 10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004

Авторы:

Кузьмич Е.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Павлова И.Е., д.м.н., главный научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Глазанова Т.В., д.м.н., главный научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Шилова Е.Р., к.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;
Бубнова Л.Н., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель Центра иммунологического типирования тканей клиники ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kuzmich E.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation;
Pavlova I.E., DSc (Medicine), Head Researcher, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation;
Glazanova T.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation;
Shilova E.R., PhD (Medicine), Leading Researcher, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation;
Bubnova L.N., DSc (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Clinic's Centre for Immunological Tissue Typing Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.04.2024
 Принята к печати 13.08.2024

Received 16.04.2024
 Accepted 13.08.2024

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЛЕРГЕНА КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 («КОРОНАДЕРМ-PS») ПО РЕЗУЛЬТАТАМ I–II ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Т.В. Савин^{1,2}, А.М. Миличкина¹, А.А. Краснов¹, Р.Н. Кузнецова^{1,2}, Е.Е. Щедеркина¹,
А.В. Сварваль¹, А.А. Шарова¹, Д.Э. Рейнгардт¹, Ю.В. Останкова¹, А.В. Губанова¹,
О.А. Петрова^{1,2}, О.Б. Жимбаева¹, А.П. Разумовская¹, И.В. Дрозд¹, А.А. Рубинштейн³,
А.С. Трулев³, И.В. Кудрявцев^{2,3}, А.А. Рябченкова⁴, Е.Л. Чирак⁴, Е.Р. Чирак⁴, А.И. Саенко⁴,
В.В. Копать⁴, И.В. Духовлинов⁴, А.С. Симбирцев^{1,2}, А.А. Тотолян^{1,2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Оценка клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 является важным инструментом контроля эффективности вакцинации и формирования постинфекционного иммунитета. По данным литературы, вирусспецифические Т-клетки, в отличие от специфических антител, сохраняются более длительный срок и обеспечивают эффективную элиминацию вируса из организма человека. Существующие методы оценки специфических Т-клеток основаны на методике проточной цитометрии, что требует специализированного лабораторного оборудования и высококвалифицированного персонала. Альтернативой данного метода является проведение кожной пробы с оценкой реакции гиперчувствительности замедленного типа. Для проведения кожной пробы был разработан препарат «КоронаДерм-PS», являющийся стерильным изотоническим раствором для внутрикожного введения, содержащим рекомбинантный гибридный белок, включающий участки структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2, продуцируемый генетически модифицируемой культурой клеток штамма *Escherichia coli* BL21. После проведения доклинических исследований, свидетельствовавших

Адрес для переписки:

Савин Тихон Валерьевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 911 288-39-74.
E-mail: savin@pasteurorg.ru

Contacts:

Tikhon V. Savin
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 288-39-74.
E-mail: savin@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Савин Т.В., Миличкина А.М., Краснов А.А., Кузнецова Р.Н., Щедеркина Е.Е., Сварваль А.В., Шарова А.А., Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Губанова А.В., Петрова О.А., Жимбаева О.Б., Разумовская А.П., Дрозд И.В., Рубинштейн А.А., Трулев А.С., Кудрявцев И.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Копать В.В., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С., Тотолян А.А. Оценка безопасности и специфической активности рекомбинантного аллергена коронавируса SARS-CoV-2 («КоронаДерм-PS») по результатам I–II фазы клинического исследования // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 900–916. doi: 10.15789/2220-7619-SAS-17790

Citation:

Savin T.V., Milichkina A.M., Krasnov A.A., Kuznetsova R.N., Shchederkina E.E., Svarval A.V., Sharova A.A., Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Gubanova A.V., Petrova O.A., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Drozd I.V., Rubinshtein A.A., Trulev A.S., Kudryavtsev I.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kopat' V.V., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S., Totolian A.A. Safety and specific activity of the recombinant SARS-CoV-2 allergen ("CoronaDerm-PS") based on phase I–II clinical trial results // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 900–916. doi: 10.15789/2220-7619-SAS-17790

© Савин Т.В. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SAS-17790>

о безопасности препарата, было принято решение о проведении I и II фазы клинического исследования с целью оценки безопасности и специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» у условно-здоровых добровольцев с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом к SARS-CoV-2. На I фазе проведенного клинического исследования с участием не болевших и не привитых добровольцев были получены данные о безопасности и хорошей переносимости препарата, что позволило провести II фазу исследования. По результатам II фазы получена информация о безопасности препарата у лиц с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом к коронавирусу путем оценки клинических и лабораторных данных. За период исследования серьезных нежелательных явлений не отмечалось, а в 93,5% нежелательные явления не потребовали никаких терапевтических или диагностических вмешательств. Для оценки специфической активности препарата проводилось сравнение результата кожной пробы с полученным индексом стимуляции продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии. По результатам ROC-анализа показатели чувствительности составили от 76,6% до 84%, а показатели специфичности — от 80% до 87,5%. Таким образом, препарат «КоронаДерм-PS» является информативным диагностическим тестом ($AUC = 0,795$), с высокой чувствительностью (79,8%) и специфичностью (80,8%), показывающий соответствующие результаты в различных группах добровольцев. По результатам анализа полученных данных показано, что препарат «КоронаДерм-PS» является качественной альтернативой лабораторных методов оценки специфического Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 с хорошей чувствительностью и специфичностью, в том числе для проведения массового скрининга.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, коронавирусный антиген Cord_PS, $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, $IFN\gamma$, Т-клеточный иммунный ответ, «КоронаДерм-PS».

SAFETY AND SPECIFIC ACTIVITY OF THE RECOMBINANT SARS-CoV-2 ALLERGEN (“CORONADERM-PS”) BASED ON PHASE I–II CLINICAL TRIAL RESULTS

Savin T.V.^{a,b}, Milichkina A.M.^a, Krasnov A.A.^a, Kuznetsova R.N.^{a,b}, Shchederkina E.E.^a, Svarval A.V.^a, Sharova A.A.^a, Reingardt D.E.^a, Ostankova Yu.V.^a, Gubanova A.V.^a, Petrova O.A.^{a,b}, Zhimbaeva O.B.^a, Razumovskaya A.P.^a, Drozd I.V.^a, Rubinshtein A.A.^c, Trulev A.S.^c, Kudryavtsev I.V.^{b,c}, Riabchenkova A.A.^d, Chirak E.L.^d, Chirak E.R.^d, Saenko A.I.^d, Kopat' V.V.^d, Dukhovlinov I.V.^d, Simbirtsev A.S.^{a,b}, Totolian A.A.^{a,b}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d LLC “ATG Service-Gene”, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The evaluation of cellular immunity to SARS-CoV-2 is a critical tool for assessing vaccination efficacy and development of post-infectious immunity. According to available studies, virus-specific T cells persist longer than antigen-specific antibodies and play a pivotal role in the effective virus elimination from human body. Current methodologies for assessing virus-specific T cells are mostly based on flow cytometry, which require specialized laboratory equipment and highly trained personnel. An alternative approach involves a skin test conducted to assess delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions. For this, there has been developed the “CoronaDerm-PS” substance, a sterile isotonic solution for intradermal administration, containing a recombinant hybrid protein that incorporates regions of SARS-CoV-2 structural proteins S, M, N, and E, produced by a genetically modified *E. coli* BL21 strain cell culture. Following preclinical studies that demonstrated the safety of the above-noted medication, Phase I and Phase II clinical trials were initiated to evaluate safety and specific activity of “CoronaDerm-PS” in apparently healthy volunteers with SARS-CoV-2 post-vaccination and post-infection immunity. In Phase I clinical trial with COVID-19 unexposed or vaccinated volunteers, the data were obtained demonstrating the safety and good tolerability of the medication, thus enabling the progression to Phase II. The Phase II results provided additional evidence on the preparation’s safety in individuals with SARS-CoV-2 post-vaccination and post-infection immunity, as assessed by clinical and laboratory data. No serious adverse events were observed during the study, and in 93.5% cases, adverse events required no therapeutic or diagnostic intervention. To assess the specific activity of the preparation, the skin test data were compared with the $IFN\gamma$ production stimulation index for $CD4^+$ T lymphocytes assessed by flow cytometry. The ROC analysis revealed sensitivity magnitude ranging from 76.6% to 84%, and specificity level ranging from 80% to 87.5%. Based on ROC analysis results, “CoronaDerm-PS” can be an informative diagnostic tool ($AUC = 0.795$), demonstrating high sensitivity (79.8%) and specificity (80.8%), with consistent results across different volunteer cohorts. Analyzing the collected data suggests that “CoronaDerm-PS” is a robust alternative to laboratory methods for evaluating SARS-CoV-2-specific T-cell immunity, with high sensitivity and specificity, suitable for large-scale screening.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus antigen Cord_PS, $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, $IFN\gamma$, T cell immune response, “CoronaDerm-PS”.

Введение

COVID-19 — острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2, приводящая к развитию пневмонита, поражению сердечно-сосудистой системы и других органов, с высоким риском смерти, особенно у пожилых людей. Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, начавшаяся в самом конце 2019 г. в КНР, быстро охватила весь мир и стала большим вызовом для систем здравоохранения стран. Благодаря быстрой разработке вакцин против новой коронавирусной инфекции удалось предотвратить большое число летальных исходов заболевания [11]. Однако, поскольку до сих пор в массовом доступе нет ни одного эффективного этиотропного лекарственного препарата против SARS-CoV-2, можно считать, что все случаи выздоровления заболевших связаны исключительно с активностью иммунной системы организма, стимуляция которой с неизбежностью осуществляется непосредственно вирусом или вакцинным препаратом, имитирующим «живой» вирус или его иммуногенные компоненты.

Оценка уровня иммунитета, выработанного против SARS-CoV-2, важна для коррекции лечения больных, мониторинга результатов вакцинации против SARS-CoV-2, обоснования необходимости ревакцинации и надзора за выработанным «коллективным» иммунитетом к коронавирусу. Изначально оценка уровня специфического иммунитета была сосредоточена на использовании тестов для обнаружения сывороточных антител класса А, М и G. Однако эти тесты не дают представления о состоянии клеточного звена иммунитета. Известно, что иммунитет к определенным патогенам опосредуется как Т-клетками, так и антителами. Причем антитела играют ведущую роль в борьбе с патогенными бактериями, но лишь вспомогательную роль — в борьбе с вирусами. Ведущая роль в борьбе с вирусами принадлежит CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL) и CD4⁺ Т-хелперам 1-го типа (Th1) [6]. Вирусспецифические CTL распознают инфицированные вирусом клетки и «убивают» их до того, как они станут источником репликации вирусов. Th1-лимфоциты облигатно участвуют в активации и регуляции иммунного ответа, антителопродукции В-клетками. Таким образом, Т-клетки играют важную роль в элиминации патогена из организма, а Т-клеточный иммунитет может сохраняться годами или даже десятилетиями [4].

Основная проблема оценки специфических Т-клеток заключается в том, что вирусспецифические Т-клетки трудно определить с помощью рутинных лабораторных тестов. Хотя

антитела играют лишь вспомогательную роль в защите от вирусов, их легче измерить в сыворотке крови, что активно используется для оценки иммунитета к SARS-CoV-2. Наличие антивирусных антител является суррогатным маркером Т-клеточного иммунитета к вирусам. Однако антительный ответ является временным и обычно затухает через 6–9 месяцев после заражения [7]. Измерение Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 дает информацию о том, сформировался ли у конкретного пациента клеточный иммунитет к коронавирусу SARS-CoV-2, и позволяет оценить, сколько людей были реально инфицированы SARS-CoV-2 и сколько из них успешно выздоровели, а также о доле успешно вакцинированных лиц. Использование только серологических тестов не позволяет полноценно оценить постинфекционный и поствакцинальный иммунитет. Во-первых, гуморальный иммунитет со временем ослабевает. Во-вторых, некоторые люди, по-видимому, реагируют на воздействие или инфекцию SARS-CoV-2 путем усиления Т-клеточного ответа без продукции антител [5].

Классические подходы определения Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 требуют дорогостоящей, многоэтапной подготовки проб и стимуляции Т-клеток *in vitro* с использованием методов, которые еще не стандартизированы и реализуются в высокоспециализированных лабораториях. Эти методы включают в себя взятие относительно большого количества крови, выделение Т-клеток из собранной крови, стимуляцию выделенных Т-клеток пептидами или белками SARS-CoV-2 при культивировании и, наконец, анализ культивированных Т-клеток с использованием внутрицитоплазматического флуоресцентного окрашивания цитокинов (в частности, интерферона-гамма, IFN γ) с помощью мультипараметрической проточной цитометрии. Альтернативой данному лабораторному методу является проведение кожной пробы для использования классической реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), в виде туберкулиновой пробы, используемой для диагностики туберкулеза более 120 лет [8]. Кожная проба ГЗТ не требует специальных методик и предназначена для проведения в условиях процедурного кабинета.

Препарат «КоронаДерм-PS» разработан для оценки Т-клеточного иммунитета, который представляет собой стерильный изотонический раствор для внутрикожного введения, содержащий рекомбинантный гибридный белок, включающий участки структурных белков S, М, N, Е коронавируса SARS-CoV-2, продуцируемый генетически модифицируемой культурой клеток штамма *Escherichia coli* BL21 [1]. На основе

литературных данных в структуру антигена были включены иммуногенные участки структурных белков S, M и E коронавируса, а также N-белок целиком. Такой выбор участков антигенов белков S, M и E обоснован данными по их иммуногенности. N-белок включен целиком, исходя из данных о том, что именно на него вырабатывается стойкий Т-клеточный иммунный ответ, а также N-белок значительно меньше подвержен мутациям, что обеспечивает специфичность препарата вне зависимости от геноварианта SARS-CoV-2, на который сформировалась иммунологическая память [2].

Препарат предназначен для оценки Т-клеточного иммунитета с помощью кожной пробы взамен теста на продукцию IFN γ Т-клетками периферической крови в условиях *in vitro*.

Проведенные доклинические исследования свидетельствуют о безопасности разработанного препарата для животных и его пригодности для тестирования наличия гиперчувствительности замедленного типа у сенсibilизированных коронавирусом аллергеном животных [3]. Это послужило основанием для проведения I и II фазы клинических исследований с целью оценки безопасности препарата, а также его специфической активности.

Целью исследования являлось изучение показателей безопасности и реактогенности, а также оценка специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» у условно-здоровых добровольцев с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом к SARS-CoV-2.

Задачи исследования соответствовали стадиям клинического исследования:

Фаза I:

– оценка безопасности и переносимости препарата «КоронаДерм-PS» при однократном внутрикожном введении здоровым добровольцам, ранее не болевшим COVID-19 и не вакцинированным от COVID-19;

Фаза II:

– оценка безопасности и реактогенности препарата «КоронаДерм-PS» при однократном внутрикожном введении здоровым добровольцам;

– определение специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» в дозе 0,2 мл при внутрикожном введении в сравнении с плацебо добровольцам четырех испытуемых групп (группа 1 — прошедшие вакцинацию «ЭпиВакКорона»; группа 2 — прошедшие вакцинацию «Гам-КОВИД-Вак»; группа 3 — прошедшие вакцинацию «КовиВак»; группа 4 — перенесшие инфекцию COVID-19, но не вакцинированные) и добровольцам контрольной группы (группа 5 — не переболевшие COVID-19 и не вакцинированные);

– сравнение результатов оценки наличия иммунитета по результатам кожной пробы и по количеству Т-клеток периферической крови, продуцирующих IFN γ в условиях *ex vivo* в ответ на препарат «КоронаДерм-PS» у добровольцев 1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й групп.

Материалы и методы

Клиническое исследование проводилось согласно протоколу CD-PS-01/21 (одобрено Советом по этике Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 298 от 18.01.2022), разрешение Министерства здравоохранения Российской Федерации № 90 от 10.02.2022) и в соответствии с принятыми нормами и правилами проведения клинических исследований. Клиническое исследование проводилось в отделении клинических испытаний Федерального бюджетного учреждения науки «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья».

Всего в рамках I–II фазы клинического исследования 325 добровольцев (42,5% — мужчины, 57,5% — женщины, средний возраст добровольцев составил $42,36 \pm 15,95$ лет, возрастной интервал — 18–92 лет) прошли этап скрининга, из них включено в исследование 289 добровольцев (42,2% — мужчины, 57,8% — женщины, средний возраст составил $43,18 \pm 15,95$ лет, возрастной интервал — 18–92 лет), соответствующие критериям включения в исследование и не имеющие критериев невключения в исследование.

Критерии включения:

1. Наличие подписанного и датированного информированного согласия добровольца на участие в клиническом исследовании до проведения любой из процедур исследования;

2. Возраст от 18 лет;

3. Индекс массы тела (ИМТ) от 18,5 до $34,9 \text{ кг/м}^2$;

4. Способность посетить все запланированные визиты и выполнить все запланированные процедуры и исследования;

5. Согласие на полное половое воздержание или использование эффективного метода контрацепции в течение всего исследования (до дня 7);

6. Доброволец соответствует одному из следующих условий:

а) вакцинирован вакциной «ЭпиВакКорона» (согласно Федеральному регистру граждан, вакцинированных от COVID-19) не менее чем за 14 и не более чем за 180 дней до включения в исследование;

б) вакцинирован вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (согласно Федеральному регистру граждан, вакцинированных от COVID-19,

то есть получивших вторую дозу двухкомпонентной вакцины при первичной вакцинации или получивших дозу вакцины «Спутник-Лайт» в режиме ревакцинации) не менее чем за 14 и не более чем за 180 дней до включения в исследование;

в) вакцинирован вакциной «КовиВак» (согласно Федеральному регистру граждан, вакцинированных от COVID-19) не менее чем за 14 и не более чем за 180 дней до включения в исследование;

г) перенес инфекцию COVID-19 (то есть имеет эпидемиологический номер в базе данных Роспотребнадзора) с датой выздоровления не менее чем за 14 и не более чем за 180 дней до включения в исследование, но не вакцинирован от COVID-19 (то есть отсутствует запись в Федеральном регистре граждан, вакцинированных от COVID-19);

д) не переносил инфекцию COVID-19 (то есть отсутствует эпидемиологический номер в базе данных Роспотребнадзора) и не вакцинирован от COVID-19 (для Фазы I или для Группы 5 в Фазе II).

Критерии невключения:

1. Детский возраст до 18 лет;
2. Беременность и период грудного вскармливания;
3. Военнослужащие и сотрудники правоохранительных органов;
4. Лица, находящиеся под стражей в следственных изоляторах и отбывающие наказания в местах лишения свободы;
5. Контакты с заболевшими COVID-19 в течение 14 дней до визита скрининга;
6. Симптомы любого острого заболевания на момент визита скрининга;
7. Любое острое заболевание, разрешившееся не менее чем за 4 недели до визита скрининга;
8. Любое острое заболевание органов дыхательной системы менее чем за 3 месяца до визита скрининга;
9. Обострение хронических заболеваний менее чем за 4 недели до начала исследования;
10. Гиперчувствительность или аллергия к любому компоненту исследуемого препарата в анамнезе;
11. Наличие в анамнезе туберкулеза (легочный и внелегочный), онкологических заболеваний, аутоиммунных заболеваний, кожных заболеваний (пузырчатка, псориаз, экзема, атопический дерматит);
12. Длительное применение (более 14 дней) иммунодепрессантов, системных глюкокортикостероидов или иммуномодулирующих препаратов в течение 6 месяцев, предшествующих визиту скрининга;
13. Положительный анализ на ВИЧ, вирусные гепатиты В и С, сифилис;

14. Вакцинация другими вакцинами от SARS-CoV-2, за исключением перечисленных: «ЭпиВакКорона», «Гам-КОВИД-Вак», «КовиВак».

Примечание. Пациенты, вакцинированные вакциной «Спутник Лайт» не в режиме ревакцинации (то есть без ранее проведенной вакцинации двумя дозами вакцины Гам-КОВИД-Вак) также не допускались к участию в исследовании;

Вакцинация любой другой вакциной в течение одного месяца, предшествующего визиту скрининга, или запланированная вакцинация в ходе исследования.

15. Прием лекарственных препаратов иммуноглобулина или препаратов крови в течение последних 3 месяцев до визита скрининга;

16. Донорство (450 мл крови или плазмы и более) менее чем за 2 месяца до визита скрининга;

17. Любые прочие острые и хронические заболевания, наличие которых по мнению исследователя делает участие добровольца в исследовании небезопасным или несовместимым с соблюдением режима, предусмотренного протоколом и получением достоверных данных в ходе исследования;

18. Участие в других клинических исследованиях с приемом исследуемого препарата (или применением медицинского изделия) менее чем за 1 месяц до визита скрининга;

19. Лица с алкогольной, лекарственной или наркотической зависимостью. Прием более чем 10 единиц алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна 500 мл пива, 200 мл вина или 50 мл водки) или анамнестические сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами;

20. Наличие психических заболеваний;

21. Несоответствие критериям включения;

22. Для Фазы I и для добровольцев, заявленных к включению в Группу 5: положительный результат анализа на антитела к SARS-CoV-2.

На первой фазе исследования процедуру скрининга прошли 28 добровольцев. В исследование по результатам скрининга были включены 20 добровольцев, ранее не переносивших новую коронавирусную инфекцию и не вакцинированные против нее. На фазе I исследования распределения добровольцев на группе и маскировка данных не проводилась.

На второй фазе исследования процедуру скрининга прошли 297 добровольцев. В исследование, по результатам скрининга, были включены 269 волонтеров, соответствующим критериям включения.

На фазе II испытуемые добровольцы, отобранные по критериям включения и невключения, были разделены на пять групп:

– *Группа 1* (n = 79) — внутрикожное введение «КоронаДерм-PS» в дозе 0,2 мл лицам, вакцинированным вакциной «ЭпиВакКорона» (Согласно Федеральному регистру граждан, вакцинированных от COVID-19);

– *Группа 2* (n = 82) — внутрикожное введение «КоронаДерм-PS» в дозе 0,2 мл лицам, вакцинированным вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (Согласно Федеральному регистру граждан, вакцинированных от COVID-19);

– *Группа 3* (n = 25) — внутрикожное введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозе 0,2 мл лицам, вакцинированным вакциной «КовиВак» (Согласно Федеральному регистру граждан, вакцинированных от COVID-19);

– *Группа 4* (n = 80) — внутрикожное введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозе 0,2 мл лицам, перенесшим инфекцию COVID-19 (то есть имеющих эпидемиологический номер в базе данных Роспотребнадзора), но не вакцинированным от COVID-19 (то есть отсутствует запись в Федеральном регистре граждан, вакцинированных от COVID-19);

– *Группа 5* (n = 23) — внутрикожное введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозе 0,2 мл лицам, не перенесшим инфекцию COVID-19 (то есть с отсутствием эпидемиологического номера в базе данных Роспотребнадзора) и не вакцинированным от COVID-19 (то есть отсутствует запись в Федеральном регистре граждан, вакцинированных от COVID-19).

На фазе II добровольцу одновременно вводился Препарат № 1 («КоронаДерм-PS») и Препарат № 2 (Натрия хлорид буфус растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций 0,9%). Препараты набирались в шприцы таким образом, что добровольцы не могли знать место введения исследуемого препарата и плацебо.

Максимальный срок участия для каждого добровольца в исследовании как фазы I, так и фазы II составлял 13 дней:

– период скрининга (Визит 0) — до 7 суток;

– амбулаторное наблюдение — 6 суток.

В случае если у добровольца отмечались непредвиденные нежелательные реакции, по особому запросу медицинского монитора добровольцу предлагалось оставаться под наблюдением врача-исследователя до полного выздоровления или стабилизации состояния.

График проведения процедур клинического исследования представлен в табл. 1.

Для оценки безопасности и переносимости препарата «КоронаДерм-PS» на первом этапе (фаза I) исследование проводилось в одной группе и без кодирования препарата. Данный дизайн позволил в полной мере оценить безопасность препарата, его переносимость, что позволило перейти ко второму этапу (фаза II)

исследования. Фаза II представляла собой простое слепое плацебо-контролируемое исследование, направленное на оценку безопасности и реактогенности исследуемого препарата, а также его специфической активности у лиц, вакцинированных различными вакцинами и у перенесших коронавирусную инфекцию, в сравнении с добровольцами, ранее не переносившими инфекцию COVID-19 и не вакцинированным от COVID-19, а также Т-клеточного иммунного ответа на специфические антигены SARS-CoV-2 у добровольцев. Данный дизайн позволяет снизить риск ложных местных и системных НЯ благодаря применению одновременно с ИП плацебо, а также получить более точную информацию о переносимости препарата «КоронаДерм-PS».

Лабораторные и инструментальные методы обследования

Флюорография. Рентгенологическое исследование легких осуществлялось на этапе скрининга при отсутствии документированных данных о прохождении ФЛГ в течение 1 года до скрининга.

Электрокардиография. Стандартная ЭКГ в 12 отведениях проводилась во время Визита 0 (скрининга). Расшифровка ЭКГ производилась врачом, обладающим достаточной квалификацией, чтобы правильно расшифровать ЭКГ.

Клинический анализ крови. У каждого добровольца исследовались следующие показатели: количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, лейкоцитарная формула аппаратным методом на анализаторе «Horiba ABX Pentra 60». Скорость оседания эритроцитов определялась по методу Панченкова.

Биохимический анализ крови. Были определены следующие показатели: активность ферментов аланинтрансаминазы, аспартаттрансаминазы, лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, холестерин, общий белок, общий билирубин, глюкоза, креатинин, мочевины, СРБ, а также общий уровень иммуноглобулинов класса E (IgE) на автоматическом анализаторе Furuno SA-270 методом турбидиметрии с использованием реагентов «ДиаС» производства АО «ДИАКОН-ДС».

Коагулограмма. Проводилось определение показателей свертывающей системы крови (МНО, АЧТВ, фибриноген) клоттинговым методом с использованием реагентов производства «НПО Ренам».

Исследование на ВИЧ, гепатит В и С. Исследование на вирус иммунодефицита человека проводилось путем определения антител к ВИЧ с помощью набора реагентов для иммуноферментного выявления антител к вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 ти-

Таблица 1. График проведения процедур клинического исследования

Table 1. Clinical trial schedule

Исследования и процедуры Event	Скрининг Screening	Инъекция, наблюдение Injection, observation	Наблюдение Observation		
	Визит 0 Visit 0	Визит 1 Visit 1	Визит 2 Visit 2	Визит 3 Visit 3	Визит 4 Visit 4
	День от –1 до –7 Day from –1 to –7		1 сутки после инъекции (+24 ч±2 ч) 1 day after injection (+24 h±2 h)	3 суток после инъекции (+72 ч±3 ч) 3 days after injection (+72 h±3 h)	6 суток после инъекции (+144 ч±4 ч) 6 days after injection (+144 h±4 h)
Получение письменного информированного согласия Informed consent form	X				
Сбор и регистрация анамнеза Anamnesis	X				
Сбор демографических и антропометрических данных Demographic and anthropometric data	X				
Сбор данных по сопутствующей терапии Concomitant therapy info	X	X	X	X	X
Физикальный осмотр Physical examination	X	X ¹	X	X	X
Витальные показатели (АД, ЧСС, ЧДД, термометрия) Vital signs (blood pressure, heart rate, respiratory rate, thermometry)	X	X ²	X	X	X
Взятие крови из вены для биохимического, клинического анализа крови, коагулограммы Blood for biochemical analysis, clinical blood test, blood clotting tests	X				X
Взятие крови из вены на ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис HIV, HBV, HCV, Syphilis tests	X				
Отбор мочи для проведения общего анализа мочи Urine test	X				X
Взятие крови из вены для определения антител к SARS-CoV-2 в ИФА Quantitative ELISA to Detect Anti-SARS-CoV-2 IgG	X				
Взятие крови из вены для определения общего IgE Serum IgE	X				X
Взятие мазков из носоглотки (или ротоглотки) на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 PCR Test for COVID-19	X				
Оценка Т-клеточного иммунитета в условиях <i>ex vivo</i> с помощью проточной цитометрии T-cells IFN γ production test	X ⁸				X ^{8,9}
Флюорография Fluorography	X				
Тест на беременность ³ Pregnancy test ³	X				X

Исследования и процедуры Event	Скрининг Screening	Иньекция, наблюдение Injection, observation	Наблюдение Observation		
	Визит 0 Visit 0	Визит 1 Visit 1	Визит 2 Visit 2	Визит 3 Visit 3	Визит 4 Visit 4
	День от –1 до –7 Day from –1 to –7		1 сутки после инъекции (+24 ч±2 ч) 1 day after injection (+24 h±2 h)	3 суток после инъекции (+72 ч±3 ч) 3 days after injection (+72 h±3 h)	6 суток после инъекции (+144 ч±4 ч) 6 days after injection (+144 h±4 h)
Проведение ЭКГ Electrocardiography	X	X ⁴	X ⁴	X ⁴	X ⁴
Оценка критериев включения/ невключения Evaluation of inclusion/exclusion criteria	X	X ⁵			
Иньекция препарата «КоронаДерм-PS» (и плацебо для Фазы II) “CoronaDerm-PS” injection (and placebo in Phase II)		X			
Оценка общих реакций Systemic reactions examination		X ⁶	X	X	X
Оценка местных реакций Local reactions examination		X ⁶	X	X	X
Оценка аллергических реакций Allergic reactions examination		X ⁶	X	X	X
Осмотр аллерголога Allergologist examination		X ⁷	X	X ⁴	X ⁴
Измерение кожной пробы Skin test measure			X	X	X
Контроль за возможным развитием НЯ и СНЯ AE and SAE monitoring		X	X	X	X
Заполнение первичной документации и перенос информации в ИРК IRB/IEC records	X	X	X	X	X

Примечание. ¹ Краткий физикальный осмотр перед проведением инъекции (общее состояние, кожа и слизистые оболочки, дыхание, сердцебиение, живот); ² термометрия перед проведением инъекции, затем все витальные показатели через 0,5, 1, 1,5 и 2 ч после инъекции; ³ для женщин, способных к деторождению; ⁴ при необходимости (по показаниям); ⁵ краткое подтверждение критериев в письменном виде; ⁶ через 0,5, 1, 1,5 и 2 ч после инъекции; ⁷ осмотр аллерголога через 30 минут обязателен, далее выполняется по показаниям; ⁸ также проведен подсчет субпопуляций CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов и их соотношения; ⁹ только для групп 1, 2 и 3 (Фаза II).

Note. ¹ Short physical examination; ² thermometry before injection, then vital signs in 0.5, 1, 1.5, 2 hours after injection; ³ woman only; ⁴ if required; ⁵ short confirmation of criteria; ⁶ 0.5, 1, 1.5, 2 hours after injection; ⁷ allergologist examination 30 minutes after injection necessary, another visit if required; ⁸ CD4⁺, CD8⁺ T cells, CD4⁺/CD8⁺ ratio tests also; ⁹ group 1, 2, 3 only (Phase II).

пов «КомбиБест анти-ВИЧ-1+2» (АО «Вектор-Бест»). Исследование на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В и суммарных антител к вирусу гепатита С проводили хемилюминесцентным иммуноанализом с использованием «ARCHITECT» Abbott.

Общий анализ мочи. Были исследованы следующие показатели: прозрачность, цвет, удельный вес, рН, белок, глюкоза, лейкоциты, эритроциты, цилиндры, соли, слизь, эпителий, бактерии, билирубин, кетоны, нитриты, уробилиноген на автоматическом анализаторе Siemens Clinitek Status Plus методом «сухой химии».

Определение антител к SARS-CoV-2. Содержание специфических антител определялось в образцах сыворотки добровольцев с помощью набора реагентов для иммуноферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 («N-CoV-2-IgG PS») согласно инструкции производителя (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Определение наличия РНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки (или ротоглотки). Определение наличия и концентрации РНК SARS-CoV-2 в образцах биологических жидкостей проводили

методом RT-PCR. Выделение РНК из всех образцов, в том числе контрольных, проводилось с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Определение РНК SARS-CoV-2 в реакции обратной транскрипции, проводили с использованием Набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени («COVID-2019 Amp») согласно инструкции производителя (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера). Результаты исследования интерпретировали в соответствии с инструкцией к набору.

Оценка Т-клеточного иммунитета в условиях ex vivo с помощью проточной цитометрии. Проведения оценки продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами проводилось по следующему протоколу исследования.

Взятие венозной крови доноров осуществляли в пробирки с добавлением гепарина (10 ЕД/мл). Кровь смешивали со стерильным физиологическим раствором, забуференным фосфатами (ЗФР) в соотношении 1:2 и наслаивали на градиент плотности 1,077 г/мл Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США), после чего центрифугировали в течение 30 мин при 400g и температуре 18–22°C. По завершении центрифугирования собирали слой мононуклеарных клеток, образовавшийся на границе раздела фаз. Полученную суспензию клеток дважды отмывали полной культуральной средой (ПКС), приготовленной на основе RPMI-1640 (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Биолот, Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Санкт-Петербург) и 2 мМ L-глутамин (Биолот, Санкт-Петербург) в течение 7 мин при 300g. После чего определяли количество полученных клеток при помощи гемоцитометра. Для постановки экспериментов в лунки 96-луночных планшетов (Sarstedt, Германия) вносили по 200 мкл клеточной суспензии ($1-2 \times 10^7$ клеток в мл) в ПКС. В качестве положительного контроля протекания реакции использовали SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) в конечной концентрации 1 мкг/мл. Равный объем культуральной среды, на которой готовили конечный раствор SEB, использовали в качестве негативного контроля протекания реакции. Для стимуляции клеток препарата «КоронаДерм-PS» в финальной концентрации 5 мкг/мл. Для подавления секреции цитокинов клетками во все образцы вносили блокатор аппарата Гольджи брэфелдин-А в конечной концентрации 10 мкг/мл. Далее образцы инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 18 ч. По завершении инкубации клетки

ресуспендировали в охлажденном ЗФР, содержащий 2% ЭТС, переносили в пробирки для центрифугирования и дважды отмывали избытком ЗФР (300g в течение 8 мин). Полученную суспензию клеток использовали для оценки внутриклеточной продукции цитокинов.

Далее осуществляли окраску образцов антителами для поверхностных антигенов CD45RA-ECD, CD4-PC7, CD3-APC-Cy7, а также красителем Zombie Aqua, позволяющим отличить живые клетки от погибших, в соответствии с рекомендациями фирм-производителей. Дальнейшую пробоподготовку осуществляли при помощи набора для окраски внутриклеточных антигенов IntraPrep Permaebilitation Reagent по инструкции фирмы-производителя. Для выявления клеток, накопивших в составе цитоплазматического компартмента $IFN\gamma$, применяли антитела против $IFN\gamma$ человека, конъюгированные с ФИТЦ. По завершении подготовки образцов к анализу клетки ресуспендировали в 2% растворе нейтрального формалина на PBS. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре NovoCyte Flow Cytometer, оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. В каждом из образцов оценивали относительное содержание $IFN\gamma^+$ клеток с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^-$, результаты выражали в виде процента $IFN\gamma^+$ лимфоцитов от общего числа Т-хелперов памяти ($CD3^+CD4^+CD45RA^-$).

Тест на беременность. Тест на беременность у женщин с сохраненным репродуктивным потенциалом проводился в условиях клинического центра с помощью тест-полоски (иммунохроматографическое определение бета-хорионического гонадотропина в моче).

Статистическая обработка данных. Для проведения статистического анализа был использован пакет статистических программ «IBM SPSS Statistics 26» (International Business Machines Corp., США).

В статистическую обработку включались данные, полученные от всех участников исследования, которые подверглись воздействию изучаемого препарата, независимо от степени следования протоколу в ходе исследования.

Демографические данные и первичные параметры эффективности оценивались с помощью параметрических и непараметрических методов.

Основные лабораторные показатели, полученные в ходе исследования, обрабатывались по правилам описательной статистики. Величины подобных показателей были представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения или медианы и интерквартильного размаха, в зависимости от характера распределения оцениваемого признака.

Данные по безопасности оценивались по частоте выявления нежелательных явлений. Частоты развития НЯ/СНЯ и других признаков в группах (частотный анализ) сравнивали с помощью критерия хи-квадрат (преимущественно) или точного критерия Фишера (если ожидаемая частота признака в одной из подгрупп менее 5. Сравнение выраженности побочных явлений (слабая, умеренная, тяжелая) между группами проводилось с помощью непараметрического теста Манна–Уитни.

При оценке безопасности препарата для клиничко-лабораторных, биохимических и иммунобиологических показателей рассчитывалось среднее арифметическое и его доверительный интервал с достоверностью $p < 0,05$.

Результаты

Оценка безопасности препарата «КоронаДерм-PS»

Несмотря на то что препарат вводился внутривенно в минимальной дозе и не ожидалось значимого проникновения в системный кровоток, введение препарата вызывало реакцию организма, которая иногда имела клиническую манифестацию. Протоколом клинического исследования была предусмотрена классификация реакций на местные, системные и аллергические.

Оценка местных и системных реакций проводилась по 4-балльной шкале (табл. 2).

Оценку температурной реакции осуществляли при подмышечном измерении по следующим категориям:

- отсутствует $\leq 37^{\circ}\text{C}$;
- слабая $> 37^{\circ}\text{C} - \leq 37,5^{\circ}\text{C}$;
- средняя $> 37,5^{\circ}\text{C} - \leq 38,5^{\circ}\text{C}$;
- сильная $> 38,5^{\circ}\text{C}$.

Связь НЯ с применением изучаемых препаратов оценивались по критериям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (табл. 3).

Регистрация нежелательных явлений (НЯ) происходила с момента введения препарата до Визита 4 включительно на основании данных, внесенных добровольцами в индивидуальные дневники самонаблюдения, а также из уст-

ных опросов добровольцев, проведения физикального и лабораторного обследования добровольцев. Клинические симптомы, которые могли развиваться после подписания информированного согласия, но до применения исследуемого препарата, регистрировались как факты анамнеза, а не как нежелательные явления.

При получении исследователем информации о возникновении НЯ при необходимости мог был назначен внеплановый визит в исследовательский центр в ближайшее возможное время. Добровольцу с НЯ оказывалась необходимая медицинская помощь. При внеплановом визите исследователь решал вопрос о возможности дальнейшего участия добровольца в исследовании.

При наличии показаний по решению врача-исследователя и лечащего врача могли быть выполнены дополнительные клинические и/или лабораторно-инструментальные исследования при внеплановых визитах и/или в случае отсутствия разрешения НЯ к моменту Визита 4.

На первом этапе (фаза I) НЯ отмечались у 12 добровольцев, всего 45 НЯ слабой ($n = 39, 86,7\%$) и средней ($n = 6, 13,3\%$) степени выраженности. При этом НЯ средней степени выраженности имели сомнительную ($n = 5$) и не подлежащую классификации ($n = 1$) связь с исследуемым препаратом. Нежелательные явления слабой степени выраженности имели связь с ИП разной степени выраженности:

- определенная ($n = 9$);
- вероятная ($n = 1$);
- возможная ($n = 5$);
- сомнительная ($n = 24$).

Все НЯ отмечавшиеся на первом этапе (фаза I) исследования закончились выздоровлением/разрешением. Трех добровольцам потребовался прием лекарственных средств с целью купирования симптоматики НЯ.

На первом этапе (фаза I) НЯ, имеющие определенную ($n = 9$), вероятную ($n = 1$) и возможную ($n = 5$) связь с введением препарата, были представлены «ожидаемыми» НЯ, имели слабую степень выраженности и не потребовали применения мер для купирования данных клинических проявлений. Нежелательные проявления, имевшие среднюю степень выражен-

Таблица 2. Оценка выраженности симптомов по 4-балльной шкале

Table 2. Assessment of the symptom severity

0	Отсутствует Absent	Отсутствие симптомов Absent of the symptoms
1	Слабая Mild	Наличие слабовыраженных симптомов Mild symptoms
2	Средняя Moderate	Симптомы, заметно нарушающие нормальную ежедневную деятельность Symptoms that significantly interrupt normal activity
3	Сильная Severe	Симптомы, препятствующие нормальной ежедневной деятельности Symptoms that prevent normal activity

ности, были расценены как имеющие сомнительную или не подлежащую классификации связь с ИП. Серьезных нежелательных явлений или летальных исходов не отмечалось, НЯ, потребовавших продления периода наблюдения или внеплановых визитов в исследовательский центр, также не отмечалось. Таким образом, на фазе I исследования была подтверждена безопасность и переносимость препарата «КоронаДерм-PS» у добровольцев.

На втором этапе (фаза II) НЯ были зафиксированы у 167 добровольцев, всего 433 НЯ слабой ($n = 383, 88,5\%$), средней ($n = 42, 9,7\%$) и сильной ($n = 8, 1,8\%$) степени выраженности. Из общего числа НЯ 192 (44,3%) нежелательных явления были расценены как местные, 235 (54,3%) — как системные НЯ, а 6 (1,4%) — как аллергические нежелательные явления. Нежелательные явле-

ния слабой степени выраженности имели следующую связь с введением ИП:

- определенная ($n = 156, 40,7\%$ от общего числа НЯ слабой степени выраженности);
- вероятная ($n = 11, 2,9\%$);
- возможная ($n = 44, 11,5\%$);
- сомнительная ($n = 168, 43,9\%$);
- условная ($n = 2, 0,5\%$);
- не подлежащая классификации ($n = 2, 0,5\%$).

Нежелательные явления средней степени выраженности имели следующую связь с введением ИП:

- определенная ($n = 10, 23,8\%$ от общего числа НЯ средней степени выраженности);
- вероятная ($n = 3, 7,1\%$);
- возможная ($n = 8, 19,0\%$);
- сомнительная ($n = 21, 50,0\%$).

Таблица 3. Оценка связи НЯ с применением исследуемого препарата

Table 3. WHO-UMC causality categories

Степень достоверности Causality term	Определение степени достоверности Assessment criteria
Определенная Certain	Клинические проявления НЯ, нарушения лабораторных показателей возникают в период приема препарата, не могут быть объяснены наличием существующих заболеваний и влиянием других факторов. Проявления НЯ регрессируют после отмены лекарства и возникают вновь при повторном назначении препарата Event or laboratory test abnormality, with plausible time relationship to drug intake. Cannot be explained by disease or other drugs. Response to withdrawal plausible (pharmacologically, pathologically). Event definitive pharmacologically or phenomenologically (i.e. an objective and specific medical disorder or a recognised pharmacological phenomenon). Rechallenge satisfactory, if necessary
Вероятная Probable/Likely	Клинические проявления НЯ, нарушения лабораторных показателей связаны по времени с приемом лекарства, вряд ли имеют отношение к сопутствующим заболеваниям или другим факторам, и которые регрессируют с отменой препарата. Ответная реакция на повторное назначение препарата неизвестна Event or laboratory test abnormality, with reasonable time relationship to drug intake. Unlikely to be attributed to disease or other drugs. Response to withdrawal clinically reasonable. Rechallenge not required
Возможная Possible	Клинические проявления НЯ, изменения лабораторных показателей связаны по времени с приемом препарата, но их можно объяснить наличием сопутствующих заболеваний или приемом других лекарств и влиянием химических соединений. Информация о реакции на отмену лекарства неясная Event or laboratory test abnormality, with reasonable time relationship to drug intake. Could also be explained by disease or other drugs. Information on drug withdrawal may be lacking or unclear
Сомнительная Unlikely	Клинические проявления НЯ, изменения лабораторных показателей возникают при отсутствии четкой временной связи с приемом лекарства; присутствуют другие факторы (лекарства, заболевания, химические вещества), которые могут быть причиной их возникновения Event or laboratory test abnormality, with a time to drug intake that makes a relationship improbable (but not impossible). Disease or other drugs provide plausible explanations
Условная Conditional/Unclassified	Клинические проявления НЯ, нарушения лабораторных показателей, отнесенные к НЯ, трудно оценивать. Необходимы дополнительные данные для оценки или же эти данные в настоящее время анализируются Event or laboratory test abnormality. More data for proper assessment needed, or additional data under examination
Не подлежащая классификации Unassessable/Unclassifiable	Сообщение о подозреваемой НР нельзя оценить, так как информация недостаточная или противоречивая. Report suggesting an adverse reaction. Cannot be judged because information is insufficient or contradictory. Data cannot be supplemented or verified

Нежелательные явления сильной степени выраженности имели следующую связь с введением ИП:

- определенная ($n = 1$, 12,5% от общего числа НЯ сильной степени выраженности);
- возможная ($n = 1$, 12,5%);
- сомнительная ($n = 6$, 75,0%).

Все НЯ отмечавшиеся на втором этапе (фаза II) исследования закончились выздоровлением/разрешением. В 93,5% случаев НЯ никаких терапевтических или диагностических мер в отношении нежелательного явления не предпринималось, клинические проявления разрешились самостоятельно в течение срока участия добровольца в клиническом исследовании.

На втором этапе (фаза II) НЯ, имеющие определенную ($n = 167$), вероятную ($n = 14$) и возможную ($n = 53$) связь с введением препарата имели слабую ($n = 211$) и среднюю ($n = 23$) степень выраженности

Также отмечены 2 НЯ с определенной (отек в месте введения) и возможной (потливость) связью с исследуемым препаратом, имевшие сильную степень выраженности. Отек в месте введения препарата, вероятнее всего, имел аллергический компонент, однако системной аллергической реакции в данном случае не отмечалось. Серьезных нежелательных явлений или летальных исходов не отмечалось. НЯ, потребовавшее продления периода наблюдения или внеплановых визитов в исследовательский центр, на втором этапе (фаза II) отмечено однократно. Однако данное НЯ (хроническая рецидивирующая крапивница с неспецифической гистаминолиберацией) является хроническим состоянием, склонным к спонтанным рецидивам. В случае рецидива во время исследования провоцирующим фактором, вероятнее всего, являлось введение препарата.

Таким образом, на фазе II исследования, была подтверждена безопасность и переносимость препарата «КоронаДерм-PS» у добровольцев.

Оценка эффективности препарата «КоронаДерм-PS»

Результат кожной пробы оценивался через одни сутки ($24 \text{ ч} \pm 2 \text{ ч}$), через трое суток ($72 \text{ ч} \pm 3 \text{ ч}$) и через шесть суток ($144 \text{ ч} \pm 4 \text{ ч}$) с момента ее проведения путем измерения с помощью прозрачной линейки поперечного (по отношению к оси предплечья) размера гиперемии и инфильтрата (папулы) в миллиметрах с фиксацией изображения на цифровую камеру. Гиперемию учитывали только в случае отсутствия инфильтрата.

Кожная реакция на препарат «КоронаДерм-PS» считалась:

- отрицательной, при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии или при наличии «уколочной реакции»;

- сомнительной, при наличии гиперемии без инфильтрата;
- положительной, при наличии папулы любого размера и/или гиперемии.

Положительные реакции на препарат «КоронаДерм-PS» условно различали по степени выраженности:

- слабо выраженная реакция, при наличии инфильтрата размером $< 5 \text{ мм}$;
- умеренно выраженная реакция, при размере инфильтрата $\geq 5 \text{ мм}$, но $< 10 \text{ мм}$;
- выраженная реакция, при размере инфильтрата $\geq 10 \text{ мм}$, но $< 15 \text{ мм}$;
- гиперергическая реакция, при размере инфильтрата $\geq 15 \text{ мм}$, при везикуло-некротических изменениях и (или) лимфангите, лимфадените независимо от размера инфильтрата.

По результатам оценки сомнительных проб (наличие гиперемии при отсутствии папулы на Визите 3) корреляции между гиперемией и индексом стимуляции продукции $\text{IFN}\gamma\text{CD4}^+$ Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии не выявлено ($p = 0,063484$). В связи с этим был сделан вывод, что наличие гиперемии не связано с уровнем клеточного иммунитета к SARS-CoV-2, но при этом умеренно связано с уровнем гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 ($p = 0,391044$). Исходя из полученных данных, сомнительные результаты принято считать отрицательным.

По результатам проведенного исследования было отмечено 74 отрицательных кожных реакции на введение препарата «КоронаДерм-PS» (из которых 45 сомнительных реакций) и 215 положительных реакций (рис. 1, II обложка). Среди положительных реакций по степени выраженности различали:

- 40 слабо выраженных реакций (18,60% от общего числа положительных);
- 91 умеренно выраженных реакций (42,32%);
- 48 выраженных реакций (22,32%);
- 36 гиперергических реакций (16,74%).

При оценке результатов по группам:

- группа 1: 6 отрицательных, 12 сомнительных, 61 положительная (9 слабовыраженных реакций, 25 умеренно выраженных, 15 выраженных реакций, 12 гиперергических);
- группа 2: 5 отрицательных, 9 сомнительных, 68 положительных (16 слабовыраженных реакций, 34 умеренно выраженных, 13 выраженных реакций, 5 гиперергических);
- группа 3: 0 отрицательных, 4 сомнительных, 21 положительная (5 слабовыраженных реакций, 5 умеренно выраженных, 4 выраженных реакций, 7 гиперергических);
- группа 4: 2 отрицательных, 15 сомнительных, 63 положительных (11 слабовыраженных реакций, 25 умеренно выраженных, 15 выраженных реакций, 12 гиперергических).

Полученные результаты кожных реакций сравнивались с полученными показателями индекса стимуляции продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии (рис. 2) в связи с тем, что данный метод является «золотым» стандартом в оценке специфического клеточного иммунитета *ex vivo* [9, 10].

При проведении ROC-анализа для оценки диагностической точности исследуемого препарата в общей выборке добровольцев получены следующие результаты: площадь под ROC-кривой — 0,795 (SE = 0,048, $p < 0,001$, 95%ДИ 0,701–0,889) (рис. 3, А).

При проведении ROC-анализа для оценки диагностической точности исследуемого препарата в группе 1 получены следующие результаты: площадь под ROC-кривой — 0,782 (SE = 0,053, $p < 0,001$, 95%ДИ 0,678–0,887) (рис. 3, Б); в группе 2 площадь под ROC-кривой — 0,843 (SE = 0,047, $p < 0,001$, 95%ДИ 0,751–0,935) (рис. 3, В); группе 3 площадь под ROC-кривой составила 0,870 (SE = 0,054, $p < 0,001$, 95%ДИ 0,764–0,975) (рис. 3, Г); в группе 4 площадь под ROC-кривой — 0,844 (SE = 0,043, $p < 0,001$, 95%ДИ 0,760–0,928) (рис. 3, Д).

Учитывая данные координат ROC-кривой и правила оценки кожной пробы, точкой отсечения (cut-off value) решено взять значение 1,0. Исходя из этого значения чувствительности и специфичности кожной пробы в общей выборке составили 79,8% и 80,8% соответственно. В группе 1 (вакцинированные вакциной «ЭпиВакКорона») показатели чувствительности и специфичности составили 76,6% и 80%, в группе 2 (вакцинированные вакциной «Гам-КОВИД-Вак») — 81,7% и 87%, в группе 3 (вакцинированные вакциной «КовиВак» — 84% и 87%, в группе 4 (перенесшие коронавиральную инфекцию, но не вакцинированные) — 79,7% и 87,5% соответственно.

Обсуждение

В ходе выполнения клинического исследования каких-либо серьезных системных, аллергических и местных (связанных со способом введения лекарственного средства) НЯ не было зарегистрировано. Большинство НЯ были кратковременными, не требующими терапии и связаны с действием и способом введения

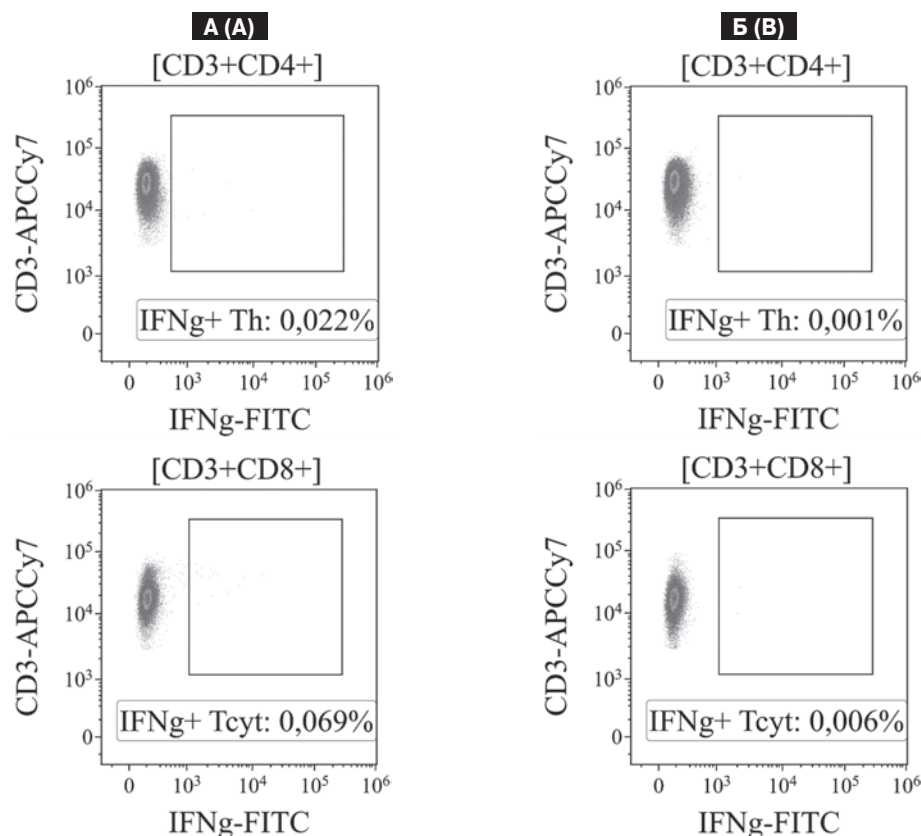


Рисунок 2. Результаты продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии

Figure 2. T-cells $IFN\gamma$ production test results

Примечание. А) Положительный результат продукции $IFN\gamma$ Т-лимфоцитами; Б) Отрицательный результат продукции $IFN\gamma$ Т-лимфоцитами.

Note. А) T-cells $IFN\gamma$ production test positive result; Б) T-cells $IFN\gamma$ production test negative result.

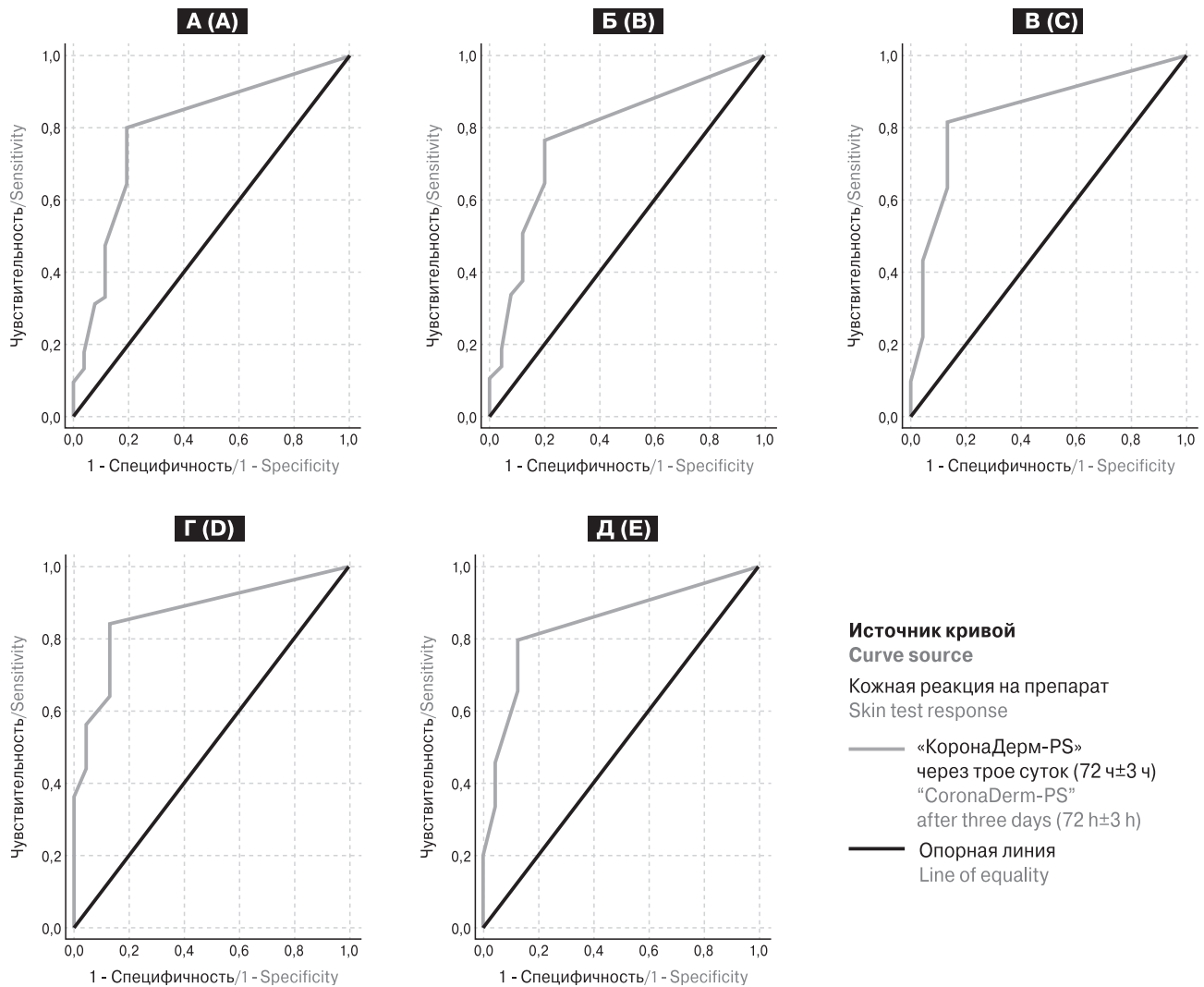


Рисунок 3. Результаты ROC-анализа (ROC-кривые)

Figure 3. ROC-analysis results (ROC-curve)

Примечание. А) ROC-кривая в общей выборке добровольцев; Б) ROC-кривая в группе 1 (ЭпиВакКорона); В) ROC-кривая в группе 2 (Гам-КОВИД-Вак); Г) ROC-кривая в группе 3 (КовиВак); Д) ROC-кривая в группе 4 (перенесшие коронавирусную инфекцию). Черная линия — линия равенства, серая линия — ROC-кривая. Ось X — частота ложноположительных результатов, ось Y — частота истинно положительных результатов.

Note. A) ROC curve, overall population; B) ROC curve, group 1; C) ROC curve, group 2; D) ROC curve, group 3; E) ROC curve, group 4. Black line — line of equality, grey line — ROC curve. X-axis: false-positive rate (1-specificity), Y-axis: true-positive rate (sensitivity).

препарата «КоронаДерм-PS». Наиболее часто встречаемыми НЯ были: боль, зуд и гиперемия в месте введения препарата.

В ходе настоящего исследования при оценке показателей общеклинических анализов крови и мочи, биохимического анализа крови, коагулограммы, фенотипирования субпопуляций лимфоцитов, параметров витальных функций не было зарегистрировано клинически значимых отклонений от нормы, а также негативной динамики клинико-лабораторных и инструментальных или объективных параметров.

При анализе полученных данных было выявлено, что оцениваемые иммунологические показатели также не имели клинически зна-

чимых отклонений от интервала референтных значений, что является одним из показателей безопасности изучаемого препарата.

По результатам оценки эффективности препарата «КоронаДерм-PS» было показано, что в сравнение с показателями индекса стимуляции продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии, исследуемый препарат является хорошим диагностическим тестом ($AUC = 0,795$), что является качественной прогностической моделью с довольно высокой чувствительностью (79,8%) и специфичностью (80,8%). Также показаны соответствующие результаты в различных группах добровольцев, что позволяет применять пре-

парат «КоронаДерм-PS» среди групп населения с поствакцинальным и постинфекционным Т-клеточным иммунитетом к новой коронавирусной инфекции.

Возможность рутинного повсеместного использования препарата «КоронаДерм-PS» для оценки специфического клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 в сочетании с описанными выше показателями диагностической эффективности доказывает качественные характеристики исследуемого препарата как инструмента для массового скрининга населения на наличие иммунитета к SARS-CoV-2 с целью проведения эпидемиологических исследований и массовой иммунопрофилактики COVID-19.

Заключение

Настоящее исследование позволило получить данные по безопасности применения препарата «КоронаДерм-PS» и его переносимости добровольцами путем оценки клинических, физикальных, лабораторных и инструментальных данных обследуемых субъектов на фоне введения препарата.

По результатам оценки эффективности препарата «КоронаДерм-PS» было показано, что в сравнении с показателями индекса стимуляции продукции IFN γ CD4⁺ Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии, исследуемый препарат является качественной прогностической моделью с достаточно высокой чувствительностью (79,8%) и специфичностью (80,8%). Показаны соответствующие показатели в раз-

личных группах добровольцев: группа 1 — 76,6% и 80%, группа 2 — 81,7% и 87%, группа 3 — 84% и 87%, группа 4 — 79,7% и 87,5% соответственно. Полученные данные позволяют применять препарат «КоронаДерм-PS» среди групп населения с поствакцинальным и постинфекционным Т-клеточным иммунитетом к SARS-CoV-2.

Исследуемый препарат показал свою безопасность с точки зрения влияния на жизненно важные функции организма, общеклинические, иммунологические и инструментальные показатели. В ходе настоящего клинического исследования при исследовании клинических и лабораторных показателей не было зарегистрировано статистически значимых отклонений от нормы, связанных с введением препарата.

Применения препарата «КоронаДерм-PS» в рутинной практике не требует специфического оборудования и специально обученного персонала, способ введения препарата позволяет его применять массово в условиях амбулаторно-поликлинического звена. Учитывая внутрикожный путь введения препарата, вероятность развития системных аллергических реакций крайне мала.

По результатам анализа данных клинического исследования можно сформулировать вывод о том, что препарат «КоронаДерм-PS» является качественной альтернативой лабораторных методов оценки специфического клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 для массового скрининга, а также является безопасным и характеризуется хорошей переносимостью.

Список литературы/References

1. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Колмаков Н.Н., Симбирцев А.С., Духовлинов И.В., Тотолян А.А. Разработка структуры и штамма-продуцента *E. coli* для антигена, содержащего последовательности белков N, S, M, E коронавируса SARS-CoV-2 // *Инфекция и иммунитет*. 2023. Т. 13, № 5. С. 653–662. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A. Designing structure and *E. coli* strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, M, E protein-related sequence antigen. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 653–662. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624
2. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Кудрявцев И.В., Трулев А.С., Савин Т.В., Зуева Е.В., Симбирцев А.С., Тотолян А.А., Духовлинов И.В. Разработка технологии очистки, биохимическая и иммунологическая характеристика рекомбинантного химерного антигена для оценки Т-клеточного иммунитета против коронавирусной инфекции // *Медицинская иммунология*. 2024. Т. 26, № 3. С. 591–606. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kudryavtsev I.V., Trulioff A.S., Savin T.V., Zueva E.V., Simbirtsev A.S., Totolian A.A., Dukhovlinov I.V. Purification technology design, biochemical and immunological characteristics of the recombinant chimeric antigen for evaluation of T cell immunity against coronavirus infection. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2024, vol. 26, no. 3, pp. 591–606. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942
3. Савин Т.В., Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Духовлинов И.В., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Шими́на Г.Г., Таранов О.С., Даниленко Е.Д., Симбирцев А.С., Тотолян А.А. Экспериментальное исследование специфической иммунологической активности и безопасности препарата «КоронаДерм-PS» для оценки клеточного иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2 // *Инфекция и иммунитет*. 2024. Т. 14, № 2. С. 238–250. [Savin T.V., Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Dukhovlinov I.V., Sysoeva G.M., Gamaley S.G., Shimina G.G., Taranov O.S., Danilenko E.D., Simbirtsev A.S., Totolian A.A. Experimentally investigated “CoronaDerm-PS”-driven SARS-CoV-2-specific cellular immunity and safety. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 238–250. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ESO-17661
4. Adamo S., Michler J., Zurbuchen Y., Cervia C., Taeschler P., Raebler M.E., Baghai Sain S., Nilsson J., Moor A.E., Boyman O. Signature of long-lived memory CD8⁺ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 2022, vol. 602, no. 7895, pp. 148–155. doi: 10.1038/s41586-021-04280-x

5. Bertoletti A., Le Bert N., Tan A.T. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity*, 2022, vol. 55, no. 10, pp. 1764–1778. doi: 10.1016/j.immuni.2022.08.008
6. Kudryavtsev I., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Vasilyev K., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Dysregulated immune responses in SARS-CoV-2-infected patients: a comprehensive overview. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 5: 1082. doi: 10.3390/v14051082
7. Lin Y., Zhu J., Liu Z., Li C., Guo Y., Wang Y., Chen K. Kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection antibody responses. *Front. Immunol.*, 2022, no. 13: 864278. doi: 10.3389/fimmu.2022.864278
8. Mantoux Ch. Intradermo-réaction de la tuberculine. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1908, vol. 147, pp. 355–357.
9. Matyushenko V., Isakova-Sivak I., Kudryavtsev I., Goshina A., Chistyakova A., Stepanova E., Prokopenko P., Sychev I., Rudenko L. Detection of IFN γ -Secreting CD4⁺ and CD8⁺ Memory T Cells in COVID-19 Convalescents after Stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells with Live SARS-CoV-2. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 8: 1490. doi: 10.3390/v13081490
10. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 158–168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017
11. Shao W., Chen X., Zheng C., Liu H., Wang G., Zhang B., Li Z., Zhang W. Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern in real-world: a literature review and meta-analysis. *Emerg. Microbes Infect.*, 2022, vol. 11, no. 1, pp. 2383–2392. doi: 10.1080/22221751.2022.2122582

Авторы:

Савин Т.В., врач аллерголог-иммунолог ДПО ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Миличкина А.М., к.м.н., главный врач медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Краснов А.А., д.м.н., старший научный сотрудник отдела биомедицинской статистики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кузнецова Р.Н., к.м.н., врач-иммунолог-аллерголог медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Щедеркина Е.Е., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярно-генетической диагностики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Сварваль А.В., к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Authors:

Savin T.V., Allergologist-Immunologist, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Milichkina A.M., PhD (Medicine), Head Physician of the Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Krasnov A.A., DSc (Medicine), Senior Researcher, Department of Biomedical Statistics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Allergologist-Immunologist, Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Shchederkina E.E., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Svarval A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Pathogens Identification Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Sharova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Шарова А.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Рейнгардт Д.Э., врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Губанова А.В., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клиничко-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Петрова О.А., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клиничко-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Жимбаева О.Б., врач Центральной клиничко-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Разумовская А.П., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клиничко-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Дрозд И.В., к.б.н., зав. центральной клиничко-диагностической лабораторией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Рубинштейн А.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Трулев А.С., к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Рябченкова А.А., научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Чирак Е.Л., научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Чирак Е.Р., научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Саенко А.И., главный технолог ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Копать В.В., директор по развитию ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Духовлинов И.В., к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А.С., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Reingardt D.E., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostic, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-related Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of immunology and Virology HIV Infection, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Gubanova A.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Petrova O.A., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zhimbayeva O.B., Physician, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Razumovskaya A.P., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Drozd I.V., PhD (Biology), Head of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Rubinstein A.A., Junior Researcher, Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Trulev A.S., PhD (Biology), Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Riabchenkova A.A., Researcher, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;

Chirak E.L., Researcher, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;

Chirak E.R., Researcher, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;

Saenko A.I., Chief Process Engineer, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;

Kopat V.V., Development Director, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Director of Science, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Medical Biotechnology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of the St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

СТРУКТУРА ОРВИ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 (2021–2022 гг.)

В.А. Сбарцалья¹, А.С. Гладких¹, Д.М. Миличкина¹, А.В. Бачевская¹, М.Р. Попова¹,
А.А. Шарова¹, Е.А. Черепанова³, В.Г. Дедков^{1,2}, А.А. Тотолян¹

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва, Россия

³ ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Острые респираторные вирусные инфекции по-прежнему остаются актуальной проблемой здравоохранения, вызывая как сезонные вспышки и эпидемии, так и глобальные пандемии. Появление новой коронавирусной инфекции стало серьезным испытанием, повлекшим за собой более 776 млн случаев заболевания и более 7 млн смертей во всем мире, что не могло не отразиться на циркуляции уже существующих сезонных патогенов. В данной работе проведен ретроспективный анализ структуры ОРВИ в период разгара пандемии COVID-19 на примере отдельно взятого субъекта (Северо-Западного федерального округа) в осенне-зимние периоды 2021–2022 гг., представлена динамика заболеваемости ОРВИ и гриппом на территории России и СЗФО, выявлены и проанализированы случаи коинфекций. Показано, что в период с января 2021 г. по август 2022 г. присоединение новой коронавирусной инфекции увеличило общую заболеваемость респираторно-вирусными инфекциями, а также снижение заболеваемости COVID-19 к концу 2022 г. в сравнении с заболеваемостью другими респираторными вирусами. Были выявлены возбудители ОРВИ, циркулировавшие на фоне пандемии COVID-19, а именно: вирус гриппа А, аденовирусы, сезонные коронавирусы, риновирусы, бокавирусы, респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа 3 типа. Результаты исследования показали, что вирус гриппа А, бокавирусы и респираторно-синцитиальный вирус чаще выявляются в виде моноинфекций и могут влиять на распространение других респираторных вирусов. В то же время аденовирусы, риновирусы и вирусы парагриппа 3 типа чаще других встречаются в виде коинфекции с COVID-19, что создает дополнительную вирусную нагрузку у пациентов и может осложнять течение заболевания.

Ключевые слова: ОРВИ, грипп, пандемия COVID-19, заболеваемость, респираторные вирусы, коинфекции.

Адрес для переписки:

Сбарцалья Валерия Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 996 580-73-36.
E-mail: sbarzaglia@pasteurorg.ru

Contacts:

Valeriya A. Sbarzaglia
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 996 580-73-36.
E-mail: sbarzaglia@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Сбарцалья В.А., Гладких А.С., Миличкина Д.М., Бачевская А.В.,
Попова М.Р., Шарова А.А., Черепанова Е.А., Дедков В.Г., Тотолян А.А.
Структура ОРВИ в Северо-Западном федеральном округе в период
пандемии COVID-19 (2021–2022 гг.) // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 5. С. 917–926. doi: 10.15789/2220-7619-API-17644

Citation:

Sbarzaglia V.A., Gladkikh A.S., Milichkina D.M., Bachevskaya A.V.,
Popova M.R., Sharova A.A., Cherepanova E.A., Dedkov V.G., Totolian A.A.
ARVI pattern in the Northwest federal district during the COVID-19 pandemic
(2021–2022) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 917–926. doi: 10.15789/2220-7619-
API-17644

ARVI PATTERN IN THE NORTHWEST FEDERAL DISTRICT DURING THE COVID-19 PANDEMIC (2021–2022)

Sbarzaglia V.A.^a, Gladkikh A.S.^a, Milichkina D.M.^a, Bachevskaya A.V.^a, Popova M.R.^a, Sharova A.A.^a, Cherepanova E.A.^c, Dedkov V.G.^{a,b}, Totolian A.A.^a

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Moscow, Russian Federation

^c Federal Hygienic and Epidemiological Center of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation

Abstract. Acute respiratory viral infections still remain a pressing health problem, causing both seasonal outbreaks and epidemics and global pandemics. The emergence of a new coronavirus infection has become a serious challenge, resulting in more than 776 million cases of disease and more than 7 million deaths worldwide, which could not but affect the circulation of existing seasonal pathogens. This paper provides a retrospective analysis of the structure of acute respiratory viral infections during the height of the COVID-19 pandemic using the example of a single subject (Northwestern Federal District) in the autumn-winter periods of 2021–2022, presents the dynamics of the incidence of acute respiratory viral infections and influenza in Russia and the Northwestern Federal District, cases of co-infections were identified and analyzed. It is shown that between 2021 and 2022, the accession of a new coronavirus infection increased the overall incidence of respiratory viral infections until August 2022, and the decrease in COVID-19 incidence by the end of 2022 compared with the incidence of other respiratory viruses. ARVI pathogens that circulated during the COVID-19 pandemic were identified, namely: influenza A virus, adenoviruses, seasonal coronaviruses, rhinoviruses, bocaviruses, respiratory syncytial virus and type 3 parainfluenza virus. The results of the study showed that influenza A virus, bocaviruses and respiratory syncytial virus are more often detected as mono-infections and can influence the spread of other respiratory viruses. While adenoviruses, rhinoviruses and type 3 parainfluenza viruses are most often found in the form of co-infection with COVID-19, which creates an additional viral load in patients and can complicate the course of the disease.

Key words: ARVI, influenza, COVID-19 pandemic, morbidity, respiratory viruses, co-infections.

Введение

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) — самая распространенная группа вирусных заболеваний. ОРВИ занимают ведущее место в структуре общей заболеваемости населения и обуславливают около 75% всей инфекционной заболеваемости [30]. Более того, сезонно-обусловленные вирусные инфекции вызывают ежегодные эпидемии во всем мире, несмотря на эпидемиологический надзор и программы по вакцинации. На сегодняшний день известно около 200 патогенов — возбудителей ОРВИ, к ним относятся РНК-содержащие риновирусы, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, энтеровирусы, эховирус, человеческий метапневмовирус и вирусы гриппа и ДНК-содержащие аденовирусы [3]. При этом возбудители ОРВИ представляют собой сложный комплекс различных вирусов, циркулирующих сезонно и вызывающих заболевания со схожей клинической картиной, дифференцирование которых возможно только лабораторными методами.

Особняком в структуре ОРВИ рассматривается заболеваемость гриппом — тяжелым сезонным респираторным заболеванием, имеющим склонность к пандемическому распространению [2]. Время сезонных эпидемий вируса гриппа варьирует во всем мире. В регионах с умеренным климатом большинство

ежегодных случаев заражения вирусом гриппа приходится на зимний период [15]. Такое повторение сезонных эпидемий объясняется продолжающейся эволюцией вирусов гриппа, которая позволяет ему избежать иммунитета, вызванного предшествующими инфекциями или вакцинацией.

Вирусы гриппа А подразделяются на подтипы в зависимости от сочетания гликопротеинов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА) на их поверхности. В настоящее время существует 18 подтипов НА и 11 подтипов NA, большинство из которых циркулирует среди диких птиц, однако три комбинации широко распространены среди людей: А/Н1N1, А/Н2N2 и А/Н3N2. Из них вирусы подтипов А/Н1N1 и А/Н3N2 в настоящее время вызывают сезонные эпидемии гриппа [19]. Глобальная картина циркуляции сезонного гриппа варьирует в зависимости от скорости антигенной эволюции различных типов и подтипов вируса [6]. Так новые антигенные варианты вирусов А/Н3N2 появляются каждые 3–5 лет, тогда как новые антигенные варианты вирусов А/Н1N1 и гриппа В появляются реже (2–5 лет для вирусов А/Н3N2 по сравнению с 3–8 годами для А/Н1N1 и вируса гриппа В) [6, 8, 20, 24]. В отличие от вирусов А/Н3N2, которые ежегодно распространяются по всему миру из Восточной и Юго-Восточной Азии и Индии, вирусы А/Н1N1 и гриппа В спорадически сохраняются локально между эпидемиями во многих

регионах мира, приводя к возникновению множества совместно циркулирующих генетических линий. Эти совместно циркулирующие линии иногда приводили к дивергентным антигенным вариантам, что указывает на необходимость в компонентах вакцины против вируса гриппа В, специфичных для региона [23, 31]. Проведение ежегодной вакцинации против гриппа по-прежнему имеет решающее значение для обеспечения иммунной прослойки населения и предотвращения крупных эпидемий.

Появление новой коронавирусной инфекции (COVID-19) не могло не отразиться на циркуляции сезонных респираторных вирусов. На начальных этапах пандемия COVID-19 создала множество проблем для систем здравоохранения во всем мире, в том числе привела к снижению эффективности надзора за гриппом и ОРВИ. Все силы были направлены на подавление пандемии, что привело к снижению количества тестов на грипп и сообщений о результатах на национальные и глобальные платформы. Стремительное распространение COVID-19 стало беспрецедентным событием в сфере здравоохранения, подвергло опасности население всего мира, вызвав более 776 млн случаев заболевания и более 7 млн смертей (ежемесячный оперативный отчет о COVID-19 на 06.11.2024, ВОЗ) [26]. В России в Северо-Западном федеральном округе (СЗФО) в 2021–2022 гг. динамика заболеваемости COVID-19 была волнообразной: в 2021 г. показатель заболеваемости колебался от 258,8 до 1185,8 (на 100 тыс. населения/месяц), в 2022 г. предельные значения показателя заболеваемости COVID-19 составляли 5544,3. В этот период сменилось несколько геновариантов SARS-CoV-2: «Альфа» (B.1.1.7); «Бета» (B.1.351); «Гамма» (P.1) и «Дельта» (B.1.617.2), вытеснивший другие геноварианты к августу 2021 г. На смену ему в 2022 г. пришел геновариант «Омикрон» (B.1.1.529), циркулирующий и в настоящее время и претерпевающий эволюционные изменения (последовательно сменившие друг друга субварианты BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, рекомбинанты XBB) [11, 12].

Резкое появление нового патогена не могло не повлиять на сложившиеся механизмы циркуляции респираторных вирусов, в том числе и гриппа [1]. Ранее было показано, что появление новых пандемических вирусов может способствовать исчезновению сезонных штаммов вируса гриппа [25]. Сейчас, когда снят статус «пандемии» COVID-19 (сообщение ВОЗ от 05.05.2023 г., [29]) и новая коронавирусная инфекция находится под контролем, пришло время задаться вопросом: какие еще респираторные вирусные инфекции циркулировали в период разгара пандемии COVID-19?

Цель настоящего исследования заключалась в ретроспективном изучении респираторных вирусов, циркулировавших в Санкт-Петербурге и СЗФО в осенне-зимние эпидемические сезоны 2021 и 2022 гг. на фоне высокой заболеваемости COVID-19.

Материалы и методы

Анализ заболеваемости проведен по данным формы федерального статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 2021–2022 гг.

В лабораторное исследование взят материал от пациентов в возрасте 18–66 лет (назофарингеальные мазки) с выраженными симптомами ОРВИ, поступивших в лабораторию ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера из медицинских организаций (МО) регионов Северо-Западного федерального округа. Образцы транспортировали в 500 мкл транспортной среды (рН = 7,0), хранили при -20°C . В данном исследовании изучение структуры ОРВИ проводилось ретроспективно, используя образцы 2021–2022 гг. Выборка из 704 образцов (сентябрь 2021 г. (212 образцов), октябрь 2022 г. (412 образцов) и декабрь 2022 г. (80 образцов)), была разделена в равном соотношении на тестовую и контрольную группы, основываясь на данных RT-PCR диагностики на отсутствие или наличие коронавируса SARS-CoV-2.

Для экстракции тотальной РНК/ДНК использовали комплект реагентов «РИБО-преп» с последующей обратной транскрипцией набором «РЕВЕРТА-L» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия). Выделенные образцы РНК/ДНК хранили при температуре -70°C .

Детекцию возбудителей в клиническом материале проводили с помощью метода RT-PCR. Обе исследуемые группы образцов были проанализированы на наличие следующих возбудителей респираторных инфекций: вирусы гриппа А (Influenza virus A) и гриппа В (Influenza virus B), респираторно-синцитиальный вирус (human Respiratory Syncytial virus — hRSv), метапневмовирус (human Metapneumovirus — hMPV), вирусы парагриппа 1–4 типов (human Parainfluenza virus-1–4 — hPIV), коронавирусы видов OC43, E229, NL63, HKUI (human Coronavirus — hCoV), риновирусы (human Rhinovirus — hRv), аденовирусы групп В, С и Е (human Adenovirus — hAdv) и бокавирусы (human Bocavirus — hBoV). Для выявления вируса гриппа использовали набор реагентов АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия), коронавируса SARS-CoV-2 — набор реагентов COVID-19 Amp (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии

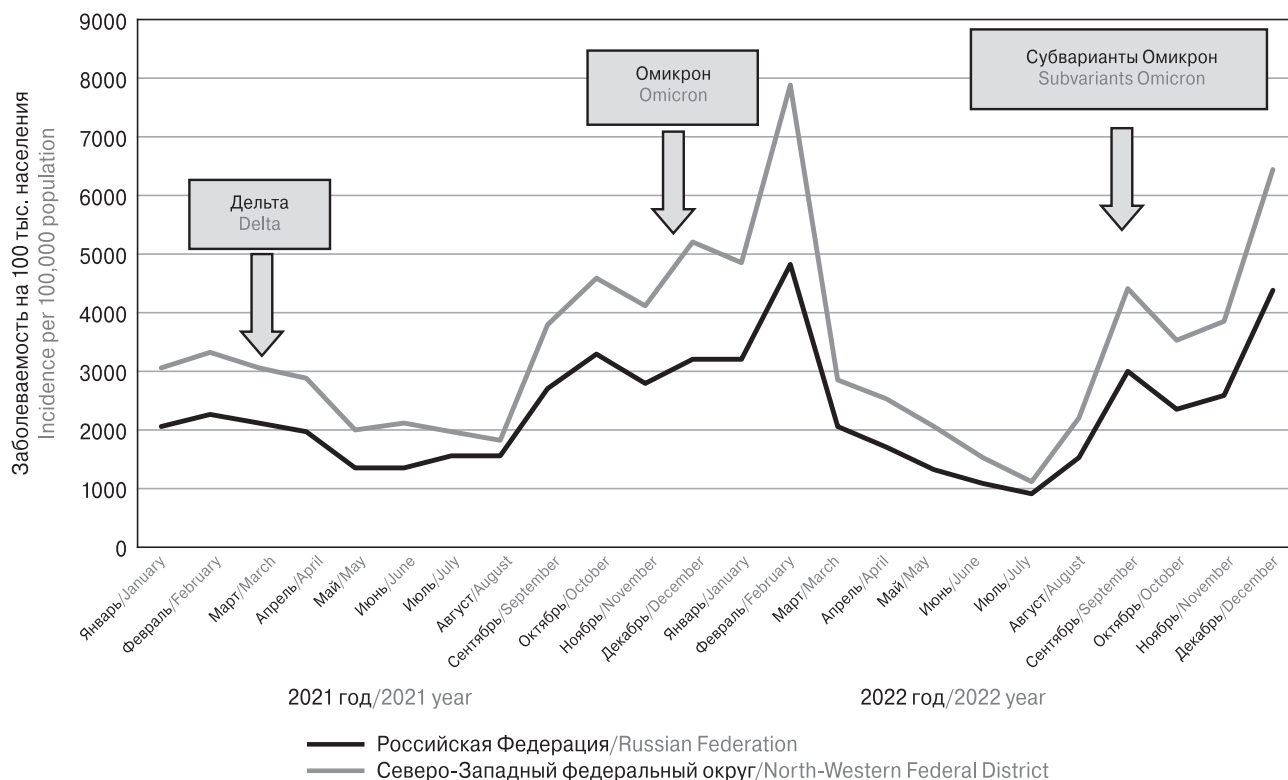


Рисунок 1. Динамика заболеваемости ОРВИ на территории России и СЗФО в периоды циркуляции различных геновариантов SARS-CoV-2

Figure 1. Dynamics of ARVI incidence rate in Russia and the Northwestern Federal District during periods of circulation of various SARS-CoV-2 genovariants

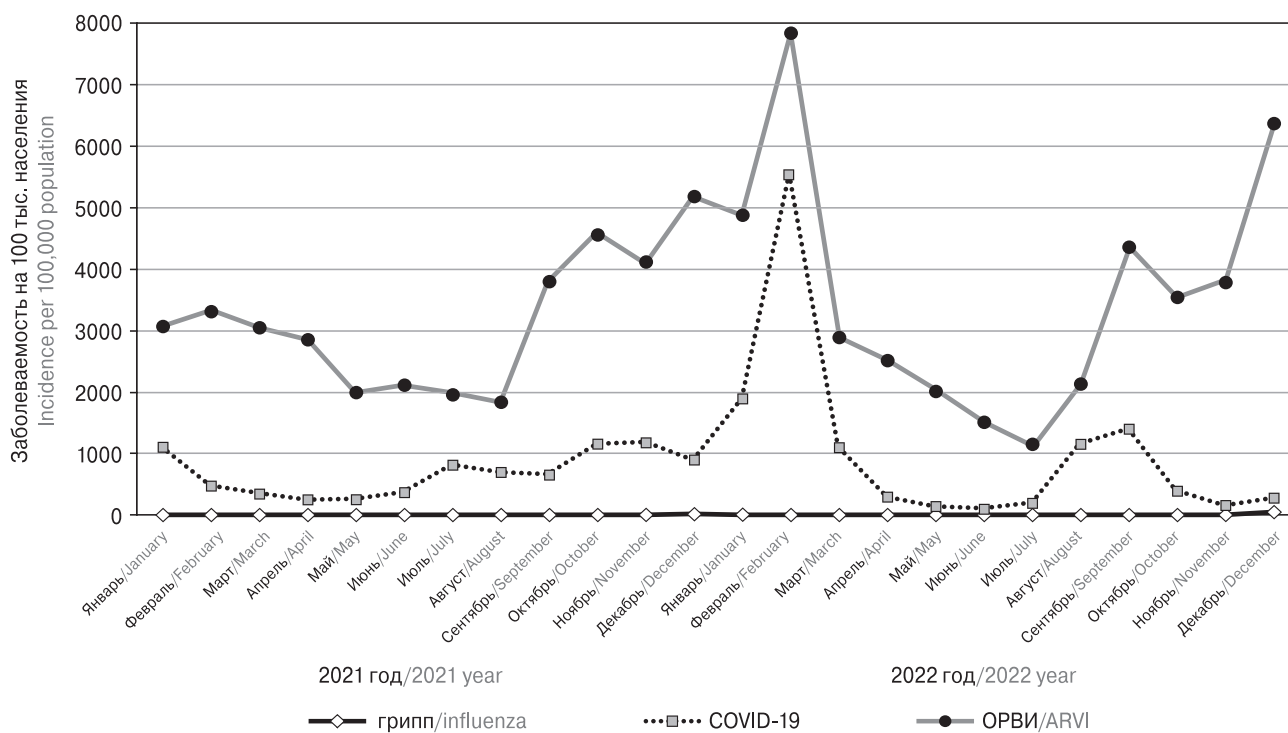


Рисунок 2. Сравнительные данные по заболеваемости гриппом, ОРВИ и COVID-19 в СЗФО в 2021–2022 гг.

Figure 2. Comparative data on incidence rate for influenza, ARVI and COVID-19 in the Northwestern Federal District in 2021–2022

имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия) [13], других вирусных возбудителей ОРВИ — набор реагентов АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) согласно рекомендациям производителей. ПЦР в реальном времени с флуоресцентной детекцией проводили на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США). Обработку результатов проводили в программе Excel (пакет MS Office).

Результаты

Анализ заболеваемости ОРВИ в 2021–2022 гг. показал более высокий уровень заболеваемости в Северо-Западном федеральном округе (СЗФО) по сравнению с таковым в Российской Федерации (РФ) в целом. При этом динамика заболеваемости ОРВИ в СЗФО и РФ была схожа, более того, все пиковые события происходили синхронно и обусловлены высоким уровнем случаев COVID-19 (рис. 1).

Учитывая высокий вклад новой коронавирусной инфекции в общую заболеваемость респираторными инфекциями, был проведен

сравнительный анализ заболеваемости ОРВИ и COVID-19 (рис. 2). При этом наблюдается сезонная динамика с характерным спадом в летний период. Траектория динамики заболеваемости ОРВИ и COVID-19 повторяется практически в точности вплоть до августа 2022 г., несмотря на период манифестного распространения геноварианта «омикрон» SARS-CoV-2. Однако к концу 2022 г. отмечается снижение заболеваемости COVID-19 и возрастание заболеваемости другими респираторными вирусами.

Если рассмотреть заболеваемость гриппом, то пик заболеваемости приходился на декабрь-январь 2021–2022 гг. с подъемом в октябре 2022 г., что соответствует типичной эпидемической картине сезонности вируса гриппа. Однако по сравнению с 2021 г., уровень заболеваемости вирусом гриппа в 2022 г. значительно выше что, возможно, обусловлено ослаблением ограничительных мер, увеличением социальных контактов и недостаточностью вакцинированных против циркулирующих штаммов гриппа в период пандемии COVID-19 (рис. 3).

На основании лабораторных данных в структуре ОРВИ в СЗФО в осенние периоды 2021–

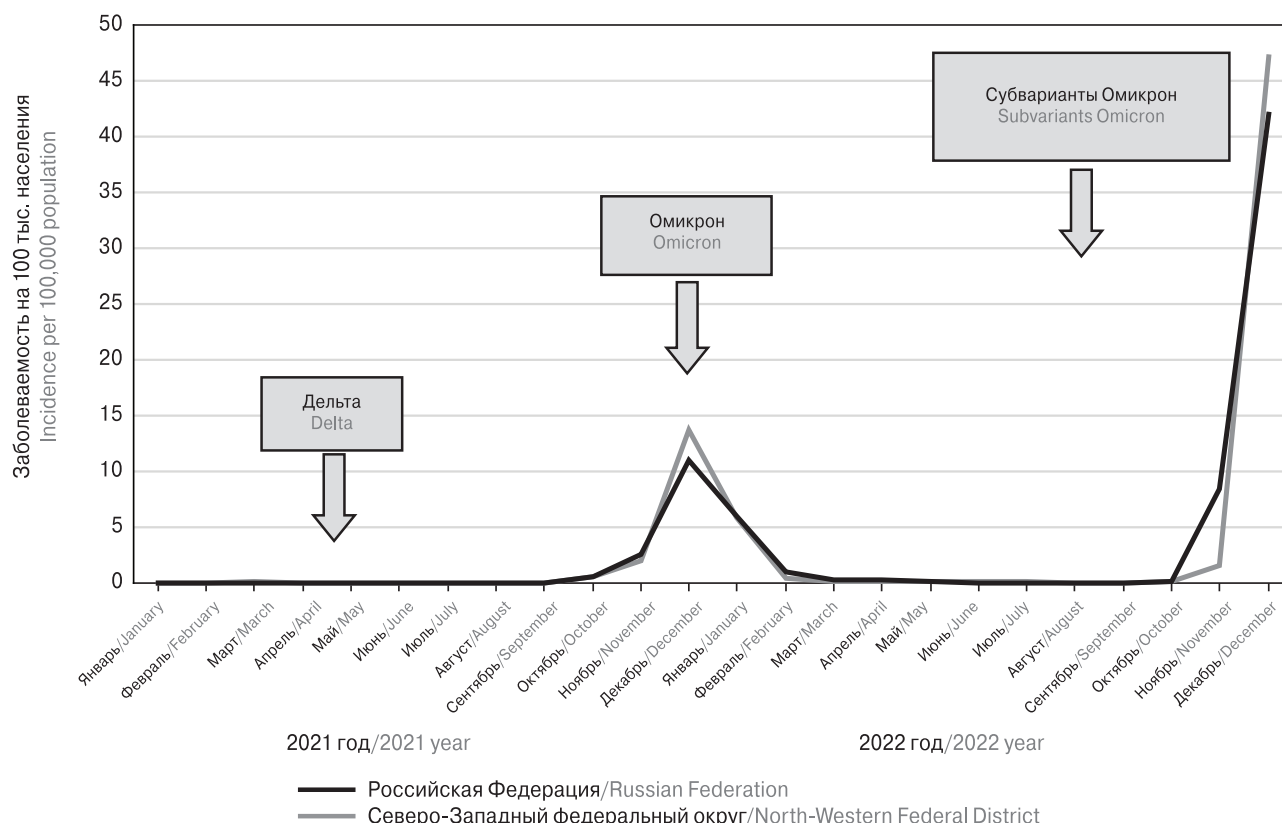


Рисунок 3. Динамика заболеваемости гриппом в Российской Федерации и СЗФО в эпидемиологические сезоны 2021–2022 гг. в условиях пандемии COVID-19 в периоды циркуляции различных геновариантов SARS-CoV-2

Figure 3. Dynamics of influenza incidence in the Russian Federation and Northwestern Federal District in the epidemiological seasons 2021–2022 during COVID-19 associated with circulation of various SARS-CoV-2 genovariants

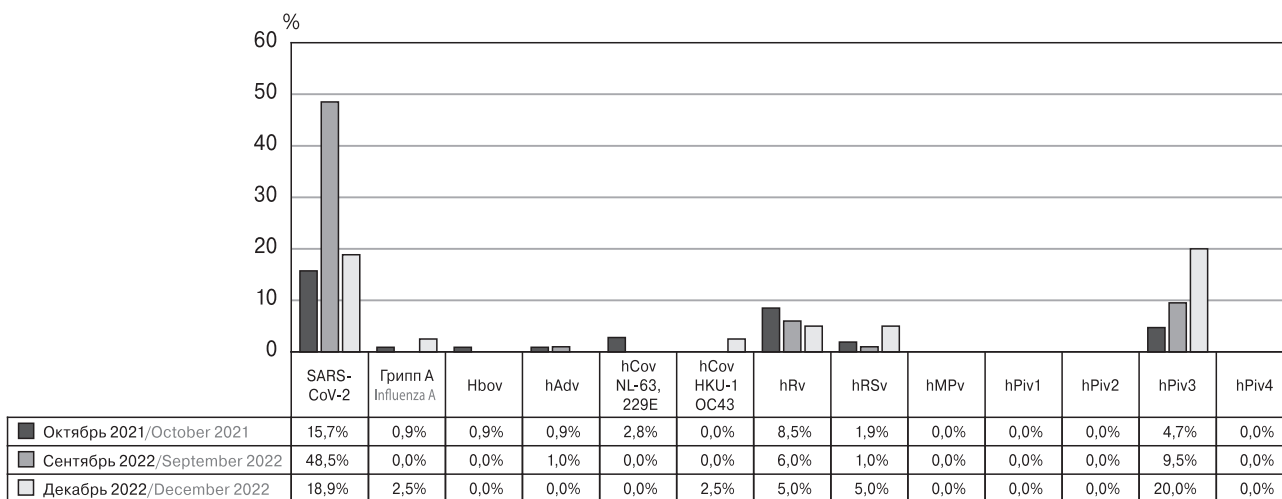


Рисунок 4. Ретроспективная оценка структуры ОРВИ в эпидемические осенне-зимние периоды 2021–2022 гг.

Figure 4. Retrospective assessment of ARVI pattern during the epidemic autumn-winter periods 2021–2022

Примечание. В 2022 г. с увеличением числа заболевших COVID-19 прослеживается отрицательная корреляция количества случаев с риновирусной и респираторно-синцитиальной инфекциями и увеличение числа случаев ОРВИ, вызванных вирусом парагриппа 3 типа.

Note. In 2022, increasing number of COVID-19 cases negatively correlated with number of rhinovirus and respiratory syncytial infection cases and increase in number of type 3 parainfluenza ARVI cases.

2022 гг. преобладали возбудители COVID-19, риновирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус парагриппа 3 типа. Ретроспективная оценка количества положительных проб на COVID-19 среди общего числа проб, поступающих на исследование, показала, что доля COVID-19 положительных проб осенью 2022 г. выросла в более чем 3 раза по сравнению с тем же сезоном в 2021 г.

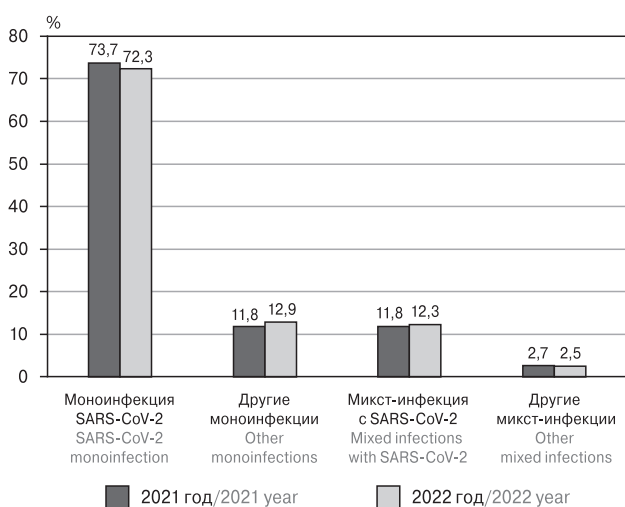


Рисунок 5. Оценка моно- и микст-инфекций в структуре ОРВИ за 2021–2022 гг.

Figure 5. Assessment of mono- and mixed infections in ARVI pattern in 2021–2022

Структура ОРВИ в осенне-зимний период 2021–2022 гг. распределилась следующим образом: выявленные в 2021 г. сезонные коронавирусы NL-63 и 229E не обнаружены в сентябре 2022 г.; число положительных тестов на риновирус и респираторно-синцитиальный вирус умеренно снижается с 8,5% до 6% и с 1,9% до 1% (октябрь 2021 г. и сентябрь 2022 г. соответственно). При этом отмечается значительный прирост, более чем в 2 раза, полученных положительных результатов на вирус парагриппа 3 типа. Наличие положительных тестов на вирус гриппа В октябре 2021 г. по сравнению с сентябрем 2022 г. (0,9% и 0% соответственно) согласуется с эпидемиологическими данными нарастания заболеваемости гриппом в более поздние осенние месяцы 2022 г. Такие вирусы, как метапневмовирус, вирусы парагриппа 1, 2 и 4 типов не обнаружены в исследуемой выборке за указанные месяцы (рис. 4).

На основании имеющихся выборок была проведена сравнительная динамика структуры ОРВИ сентябре–декабре 2022 г.: по ходу эпидемического сезона наблюдалось значительное повышение числа положительных тестов на наличие в образцах сезонных коронавирусов HKU-1, OC43, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа 3 типа и вируса гриппа А, что также согласуется с резким ростом заболеваемости гриппом в конце 2022 г.

При оценке структуры моно- и микст-инфекций, вызвавших острые респираторные

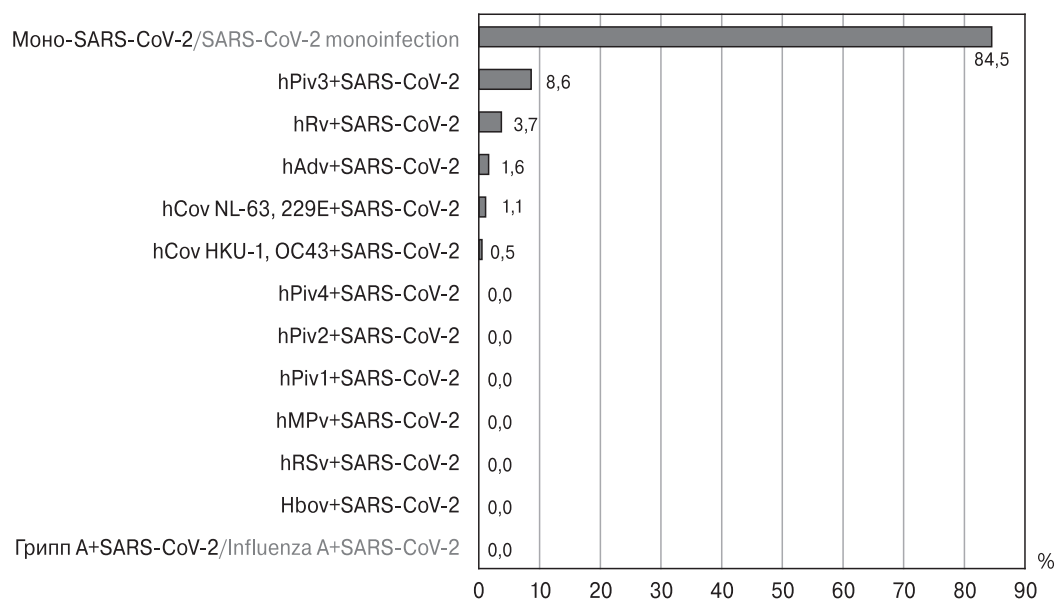


Рисунок 6. Распределение случаев коинфекций у пациентов с положительным результатом на SARS-CoV-2

Figure 6. Distribution of co-infection cases in SARS-CoV-2 positive patients

заболевания в 2021 и 2022 гг., было выявлено, что моноинфекции SARS-CoV-2 лидировали среди всех идентифицированных ОРВИ: 73% в 2021 г. и 72% в 2022 г. Общее число моноинфекций всех остальных респираторных вирусов колебалось от 12% до 14%. Микст-инфекции с SARS-CoV-2 в 2021 г. и 2022 г. показали одинаковые значения — 12%. Уровень микст-инфекций других респираторных вирусов в 2021 и 2022 гг. незначительно отличался (2021 г. — 2,7%; 2022г — 2,5%), оставаясь на довольно низком уровне по сравнению с моноинфекциями этих же вирусов (рис. 5).

При рассмотрении числа моноинфекций SARS-CoV-2 и микст-инфекций с SARS-CoV-2 (если контрольная группа взята за 100%) во всей исследуемой выборке за 2021 и 2022 гг. четко прослеживается подавляющий процент моноинфекций SARS-CoV-2 — 90% (рис. 6). В случае микст-инфекций: микст-инфекция SARS-CoV-2 + парагрипп 3 типа составляла 8,6% от всех положительных на COVID-19 образцов, далее следовали SARS-CoV-2 + риновирус (3,7%), SARS-CoV-2 + аденовирус (1,6% случаев) и по 1% случаев микст-инфекций SARS-CoV-2 с сезонными коронавирусами. В ходе анализа выборки не были выявлены микст-инфекции SARS-CoV-2 с такими вирусами как вирус гриппа А, метапневмовирус, бокавирусы, респираторно-синцитиальный вирус и вирусы парагриппа 1, 2 и 4 типов. Также отмечались единичные случаи наличия трех инфекций: SARS-CoV-2 + hRv + hPiv-3 и SARS-CoV-2 + сезонный коронавирус + hPiv-3.

Обсуждение

Отчеты Всемирной организации здравоохранения констатируют, что ежегодно в мире сезонные эпидемии гриппа могут вызывать 3–5 млн тяжелых случаев и 290–650 тыс. летальных исходов от респираторных заболеваний (WHO, сообщение от 03.10.2023 г.) [28]. Однако настоящим «бичом» нашего времени стала стремительно эволюционирующая новая коронавирусная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, унесшая более 7 млн жизней [9, 17, 26]. Критический период пандемии 2020–2022 гг., когда заболеваемость COVID-19 достигала максимальных значений и не имела сезонного характера, не мог не отразиться на циркуляции других респираторных вирусов. Снижение доступности и количества тестов на грипп и другие ОРВИ не давало возможности оценить циркуляцию сезонных вирусов в реальном времени, поскольку лица с респираторными симптомами часто направлялись на оценку и тестирование на SARS-CoV-2 в первую очередь [17]. Характерная картина наблюдалась по всему миру в весенние и зимние эпидемиологические периоды 2020–2021 гг., а именно снижение количества выявленных случаев гриппа на 90% по сравнению с предыдущими годами с последующим появлением зимнего пика заболеваемости в 2021–2022 гг. [17, 21, 25].

На этом фоне в научном сообществе возникла дискуссия, могла ли пандемия COVID-19 повлиять на циркуляцию сезонных вирусных инфекций или же полностью вытеснить их.

В настоящем исследовании, несмотря на то что эксперимент проведен на узкой выборке и затрагивает только отдельный регион Российской Федерации, показано, что циркуляция сезонных вирусов в период пандемии COVID-19 претерпела существенные изменения по сравнению с допандемийным периодом. Так, в структуре заболеваемости ОРВИ в сезоны 2012–2016 гг. в Санкт-Петербурге преобладали аденовирусы, риновирусы, респираторно-синцитиальные вирусы [4], в то время как на основании исследуемой выборки в эпидемические сезоны 2021–2022 гг. вместе с SARS-CoV-2 наиболее часто циркулировали сезонные коронавирусы, риновирусы и вирус парагриппа 3 типа.

В динамике течения ОРВИ важную роль могут играть микст-инфекции, обусловленные сложными вирус-вирусными и вирус-бактериальными ассоциациями с развитием вторичных процессов (присоединение к заболеванию другого вирусного или бактериального заболевания). По сути такое биологическое взаимодействие между вирусами может либо усиливать, либо ингибировать их репликацию [7]. Описаны случаи, когда циркуляция одного респираторного вируса ведет к задержке или прекращению распространения другого. Так, было показано, что на распространение вирусов гриппа влияют циркулирующие респираторно-синцитиальный вирус (hRSv), риновирус (hRv), вирус парагриппа (hPiv-3) и аденовирус (hAdv) [14]. И наоборот, пандемический вирус гриппа способен сдерживать распространение вспышек респираторно-синцитиального вируса [10, 16]. Причиной тому служит конкуренция за ресурсы клетки-мишени, за счет чего может подавляться репликация вируса и дальнейшая его передача [18]. Анализ исследуемой выборки показал, что на фоне пандемии COVID-19 вирус гриппа А, бокавирусы и респираторно-синцитиальный вирус проявляли себя как моноинфекции, вызывая ОРВИ самостоятельно. В то время как аденовирусы, риновирусы и вирусы парагриппа 3 типа могут создавать дополнительную вирусную нагрузку у пациентов

с COVID-19. Аденовирусная инфекция, сезонные коронавирусы четырех типов чаще проявлялись в виде микст-инфекций с COVID-19, в то время как риновирус и вирус парагриппа 3 типа могут присутствовать в виде микст-инфекции, но чаще в виде моноинфекции. Грипп А, бокавирус, респираторный синцитиальный вирус чаще проявляются в виде моноинфекции, что может быть свидетельством конкурентного вытеснения одних возбудителей другими.

Вирусы SARS-CoV-2 и гриппа не имеют одинаковых рецепторов, и следовательно, коинфекция вируса гриппа может изменить репликацию и тяжесть течения SARS-CoV-2 [22]. Показано, что у пациентов, инфицированных одновременно SARS-CoV-2 и гриппом, наблюдались более тяжелые последствия заболевания в результате наличия коинфекции по сравнению с таковыми в контрольной группе без нее. Кроме того у пациентов с микст-инфекцией риск смерти был на 5,9% выше, чем у пациентов с моноинфекциями гриппа или SARS-CoV-2 [5]. По результатам настоящего исследования отягощенность течения присутствием микст-инфекции определить не удалось, подтвержденные случаи гриппа А имели среднюю тяжесть течения и проявились у пациентов с отрицательным RT-PCR на SARS-CoV-2.

Заключение

Несомненно, пандемия COVID-19 оказала значительное влияние на структуру заболеваемости сезонными ОРВИ. Так как эволюция данного вируса активно продолжается, еще рано говорить о закономерностях его циркуляции. Становление эпидемического процесса нового возбудителя оказывает сильное влияние на циркуляцию респираторных вирусов, в том числе и вируса гриппа, смещая их сезонные циклы. Грамотный и всесторонний анализ ежегодной ситуации с ОРВИ позволит оценить наметившиеся тренды и поможет в понимании биологии и эволюционной стратегии нового коронавируса.

Список литературы/References

1. Киселева И.В., Ксенафонтов А.Д. Рино- и РС-вирусы в пандемию COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 624–638. [Kiseleva I.V., Ksenafontov A.D. Rhino- and RS-viruses in the COVID-19 pandemic *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 4, pp. 624–638. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-RAR-1826]
2. Кузнецов О.К. Условия, способствующие появлению вируса гриппа с пандемическим потенциалом. Профилактические меры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2003. № 3 (10). С. 5–12. [Kuznetsov O.K. The features of influenza vaccinal prevention. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2003, no. 3 (10), pp. 5–12. (In Russ.)]
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Бовин Н.В., Игнатьева А.В., Краснослободцев К.Г., Феодоритова Е.Л., Трушакова С.В., Бреслав Н.В., Меркулова Л.Н., Мукашева Е.А., Хлопова И.Н., Воронина О.Л., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Вартанян Н.В., Кистенева Л.Б., Кириллов И.М., Прошина Е.С., Росаткевич А.Г., Кружкова И.С., Заплатников А.Л., Базарова М.В., Сметанина С.В., Харламов М.В., Карпов Н.Л., Шихин А.В. Особенности циркуляции вирусов гриппа и ОРВИ в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. в отдельных

- регионах России // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65, № 6. С. 335–349. [L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Bovin N.V., Ignatjeva A.V., Krasnoslobodtsev K.G., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., Breslav N.V., Merkulova L.N., Mukasheva E.A., Khlopova I.N., Voronina O.L., Aksonova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Vartanjan R.V., Kisteneva L.B., Kirillov I.M., Proshina E.S., Rosatkevich A.G., Kruzhkova I.S., Zaplatnikov A.L., Bazarova M.V., Smetanina S.V., Kharlamov M.V., Karpov N.L., Shikhin A.V. Peculiarities of the influenza and ARVI viruses during epidemic season 2019–2020 in some regions of Russia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, vol. 65, no. 6, pp. 335–349 (In Russ.)]
4. Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В., Мусаева Т.Д., Афанасьева В.С., Го А.А., Образцова Е.А., Суховецкая В.Ф., Комиссаров А.Б. Этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. // Вопросы вирусологии. 2018. Т. 63, № 5. С. 233–239. [Pisareva M.M., Eder V.A., Buzitskaya Zh.V., Musaeva T.D., Afanaseva V.S., Go A.A., Obraztsova E.A., Sukhovetskaya V.F., Komissarov A.B. Etiological structure of influenza and other ARVI in St. Petersburg during epidemic seasons 2012–2016. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 233–239. (In Russ.)]
 5. Bai L., Zhao Y., Dong J., Liang S., Guo M., Liu X., Wang X., Huang Z., Sun X., Zhang Z., Dong L., Liu Q., Zheng Y., Niu D., Xiang M., Song K., Ye J., Zheng W., Tang Z., Tang M., Zhou Y., Shen C., Dai M., Zhou L., Chen Y., Yan H., Lan K., Xu K. Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity. *Cell Res.*, 2021, vol. 31, no. 4, pp. 395–403. doi: 10.1038/s41422-021-00473-1
 6. Bedford T., Riley S., Barr I.G., Broor S., Chadha M., Cox N.J., Daniels R.S., Gunasekaran C.P., Hurt A.C., Kelso A., Klimov A., Lewis N.S., Li X., McCauley J.W., Odagiri T., Potdar V., Rambaut A., Shu Y., Skepner E., Smith D.J., Suchard M.A., Tashiro M., Wang D., Xu X., Lemey P., Russell C.A. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*, 2015, vol. 523, no. 7559, pp. 217–220. doi: 10.1038/nature14460
 7. Casalegno J.S., Ottmann M., Duchamp M.B., Escuret V., Billaud G., Frobert E., Morfin F., Lina B. Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, vol. 16, no. 4, pp. 326–329. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03167.x
 8. Chen R., Holmes E.C. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J. Mol. Evol.*, 2008, vol. 66, no. 6, pp. 655–663. doi: 10.1007/s00239-008-9119-z
 9. Country & Technical Guidance — Coronavirus disease (COVID-19). Geneva: World Health Organization, 2020. URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance-publications>
 10. Domenech de Cellès M., Casalegno J.S., Lina B., Opatowski L. Estimating the impact of influenza on the epidemiological dynamics of SARS-CoV-2. *Peer J.*, 2021 vol. 9: e12566. doi: 10.7717/peerj.12566
 11. Gladkikh A., Dedkov V., Sharova A., Klyuchnikova E., Sbarzaglia V., Arbuzova T., Forghani M., Ramsay E., Dolgova A., Shabalina A., Tsyganova N., Totolian A. Uninvited guest: arrival and dissemination of omicron lineage SARS-CoV-2 in St. Petersburg, Russia. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 8: 1676. doi: 10.3390/microorganisms10081676
 12. Gladkikh A., Dedkov V., Sharova A., Klyuchnikova E., Sbarzaglia V., Kanaeva O., Arbuzova T., Tsyganova N., Popova A., Ramsay E., Totolian A. Epidemiological Features of COVID-19 in Northwest Russia in 2021. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 5: 931. doi: 10.3390/v14050931
 13. Goncharova E.A., Dedkov V.G., Dolgova A.S., Kassirov I.S., Safonova M.V., Voytsekhovskaya Y., Totolian A.A. One-step quantitative RT-PCR assay with armored RNA controls for detection of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 3, pp. 1694–1701. doi: 10.1002/jmv.26540
 14. Linde A., Rotzén-Ostlund M., Zweyberg-Wirgart B., Rubinova S., Brytting M. Does viral interference affect spread of influenza? *Euro Surveill.*, 2009, vol. 14, no. 40: 19354
 15. Lowen A.C., Mubareka S., Steel J., Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog.*, 2007, vol. 3, no. 10, pp. 1470–1476. doi: 10.1371/journal.ppat.0030151
 16. Mak G.C., Wong A.H., Ho W.Y., Lim W. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 on the circulation of respiratory viruses 2009–2011. *Influenza Other Respir Viruses*, 2012, vol. 6, no. 3: e6-10. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00323.x
 17. Olsen S.J., Azziz-Baumgartner E., Budd A.P., Brammer L., Sullivan S., Pineda R.F., Cohen C., Fry A.M. Decreased influenza activity during the COVID-19 pandemic—United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020. *Am. J. Transplant.*, 2020, vol. 20, no. 12, pp. 3681–3685. doi: 10.1111/ajt.16381
 18. Opatowski L., Baguelin M., Eggo R.M. Influenza interaction with cocirculating pathogens and its impact on surveillance, pathogenesis, and epidemic profile: a key role for mathematical modelling. *PLoS Pathog.*, 2018, vol. 14, no. 2: e1006770. doi: 10.1371/journal.ppat.1006770
 19. Petrova V.N., Russell C.A. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2018, vol. 16, no. 1, pp. 47–60. doi: 10.1038/nrmicro.2017.118
 20. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, vol. 305, no. 5682, pp. 371–376. doi: 10.1126/science.1097211
 21. Soo R.J.J., Chiew C.J., Ma S., Pung R., Lee V. Decreased Influenza Incidence under COVID-19 Control Measures, Singapore. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, vol. 26, no. 8, pp. 1933–1935. doi: 10.3201/eid2608.201229
 22. Stowe J., Tessier E., Zhao H., Guy R., Muller-Pebody B., Zambon M., Andrews N., Ramsay M., Lopez Bernal J. Interactions between SARS-CoV-2 and influenza, and the impact of coinfection on disease severity: a test-negative design. *Int. J. Epidemiol.*, 2021, vol. 50, no. 4, pp. 1124–1133. doi: 10.1093/ije/dyab081
 23. Terajima M., Cruz J., Co M.D., Lee J.H., Kaur K., Wrasmert J., Wilson P.C., Ennis F.A. Complement-dependent lysis of influenza A virus-infected cells by broadly cross-reactive human monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 24, pp. 13463–13467. doi: 10.1128/JVI.05193-11
 24. Vijaykrishna D., Holmes E.C., Joseph U., Fourment M., Su Y.C., Halpin R., Lee R.T., Deng Y.M., Gunalan V., Lin X., Stockwell T.B., Fedorova N.B., Zhou B., Spirason N., Kühnert D., Bošková V., Stadler T., Costa A.M., Dwyer D.E., Huang Q.S., Jennings L.C., Rawlinson W., Sullivan S.G., Hurt A.C., Maurer-Stroh S., Wentworth D.E., Smith G.J., Barr I.G. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *Elife*, 2015, vol. 4: e05055. doi: 10.7554/eLife.05055

25. Wang M.H., Hu Z.X., Feng L.Z., Yu H.J., Yang J. [Epidemic trends and prevention and control of seasonal influenza in China after the COVID-19 pandemic]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, 2024, vol. 104, no. 8, pp. 559–565. (In Chinese). doi: 10.3760/cma.j.cn112137-20231220-01430
26. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Epidemiological Updates and Monthly Operational Updates. URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (30.08.2024)
27. WHO. Global Influenza Strategy 2019–2030. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515320> (07.01.2024)
28. WHO. Influenza (Seasonal). URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (20.12.2023)
29. WHO. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. URL: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (15.03.2024)
30. WHO. Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year. URL: <https://www.who.int/news/item/13-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year> (20.12.2023)
31. Xie Y., Tian X., Zhang X., Yao H., Wu N. Immune interference in effectiveness of influenza and COVID-19 vaccination. *Front. Immunol.*, 2023, no. 14: 1167214. doi: 10.3389/fimmu.2023.1167214

Авторы:

Сбарцалья В.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Гладких А.С., к.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Миличкина Д.М., лаборант-исследователь лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Бачевская А.В., лаборант-исследователь лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Попова М.Р., аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Шарова А.А., аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Черепанова Е.А., и.о. зав. отделом обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Дедков В.Г., к.м.н., зам. директора по науке ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; ведущий научный сотрудник Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва, Россия.

Тотоян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sbarzaglia V.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Gladkikh A.S., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Milichkina D.M., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Bachevskaya A.V., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Popova M.R., PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Sharova A.A., PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetic Monitoring, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Cherepanova E.A., Acting Deputy Head of the Epidemiological Surveillance Department, Federal Hygienic and Epidemiological Center of Rosпотребнадзор, Moscow, Russian Federation;

Dedkov V.G., PhD (Medicine), Deputy Director on Science, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Moscow, Russian Federation;

Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of the St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМОВ ПАТОГЕНОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

С.Ю. Тюкавкина¹, Г.Г. Харсеева¹, М.П. Костинов^{2,3}, А.А. Алиева¹, В.В. Балахнова¹,
Э.Л. Алутина¹, В.А. Чайкина¹, В.В. Волкова¹

¹ ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

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

Резюме. В связи с высокой распространенностью острых респираторных инфекций у детей представляло интерес выяснить состав бактериальных и вирусно-бактериальных ассоциаций микроорганизмов, населяющих респираторный тракт. Для идентификации патогенов дыхательных путей, особенно вирусов и некультивируемых бактерий, целесообразно использовать молекулярно-генетические методы исследования, в частности, ПЦР. Цель работы — сравнительный анализ частоты обнаружения геномов патогенов дыхательного тракта у детей с острыми респираторными инфекциями и практически здоровых. *Материалы и методы.* Обследованы дети (97 человек), из которых 35 человек — с острыми респираторными инфекциями верхних дыхательных путей (назофарингит, фарингит, ларингит) (ОРИ ВДП), 32 человека — с острыми респираторными инфекциями нижних дыхательных путей (острый бронхит, острый обструктивный бронхит) (ОРИ НДП) и 30 человек — практически здоровые на момент обследования. В отделяемом ротоглотки с помощью ПЦР определяли РНК и ДНК вирусных и бактериальных патогенов. Использованы тест-системы производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест». *Результаты.* Анализ частоты выявления ДНК и РНК патогенов бактериальной и вирусной природы показал наличие их широкого спектра (20 различных видов/штаммов из 27 определяемых) в биоматериале из ротоглотки у всех обследованных детей. Наибольшее разнообразие и частота обнаружения геномов патогенов обнаружены у практически здоровых обследованных и детей с ОРИ ВДП (ДНК представителей семейства *Herpesviridae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, MSSA, MRCoNS). В составе микрофлоры преобладали ассоциации из 4–6 патогенов, а «ядром» как бактериальных, так и вирусно-бактериальных ассоциаций являлось сочетание *S. pneumoniae* и *H. influenzae* (в 93,3% и 60,0% случаев соответственно). В бактериальных ассоциациях у здоровых детей выявляли также стафилококки (MRSA и MRCoNS) и *P. aeruginosa*, у детей с ОРИ ВДП — MSSA и очень редко — другие виды бактерий. У детей с инфекциями НДП, большинство из которых (75,0±7,7%) относились к категории длительно болеющих и имели осложненное течение заболевания, обнаружено заметное обеднение (уменьшение таксономического разнообразия) назофарингеальной микробиоты. *Заключение.* Представленные данные свидетельствуют о присутствии в биоматериале обследованных детей молекулярно-генетических маркеров широкого спектра патогенов в виде вирусно-бактериальных и бактериальных ассоциаций, состав которых вариабелен и зависит от клинического статуса пациентов. Обнаружение геномов патогенов является важным для решения вопроса о выборе этиотропной терапии на ранних этапах заболевания, а также назначения пробиотических препаратов, способных восстановить баланс микрофлоры дыхательных путей.

Ключевые слова: микробиом дыхательных путей, респираторные инфекции, дети, вирусные патогены, бактериальные патогены.

Адрес для переписки:

Харсеева Галина Георгиевна
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29,
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (863) 250-41-09. E-mail: galinagh@bk.ru

Contacts:

Galina G. Kharseeva
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nachitsevskij lane, 29,
Rostov State Medical University.
Phone: +7 (863) 250-41-09. E-mail: galinagh@bk.ru

Для цитирования:

Тюкавкина С.Ю., Харсеева Г.Г., Костинов М.П., Алиева А.А.,
Балахнова В.В., Алутина Э.Л., Чайкина В.А., Волкова В.В. Частота
обнаружения геномов патогенов у детей с острыми респираторными
инфекциями // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 927–935.
doi: 10.15789/2220-7619-TFO-17654

Citation:

Tyukavkina S.Yu., Kharseeva G.G., Kostinov M.P., Alieva A.A., Balakhnova V.V.,
Alutina E.L., Chaikina V.A., Volkova V.V. The frequency of detected pathogen
genomes in children with acute respiratory infections // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5,
pp. 927–935. doi: 10.15789/2220-7619-TFO-17654

© Тюкавкина С.Ю. и др., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TFO-17654>

THE FREQUENCY OF DETECTED PATHOGEN GENOMES IN CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS

Tyukavkina S.Yu.^a, Kharseeva G.G.^a, Kostinov M.P.^{b,c}, Alieva A.A.^a, Balakhnova V.V.^a, Alutina E.L.^a, Chaikina V.A.^a, Volkova V.V.^a

^a Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

^b I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Due to the high prevalence of acute respiratory infections in children, it was of interest to determine the composition of bacterial and viral-bacterial associations for respiratory tract inhabiting microorganisms. To identify respiratory tract pathogens, especially viruses and unculturable bacteria, it is advisable to use molecular genetic research methods particularly PCR. The work was aimed at comparatively analyzing rate of genome detection for respiratory tract pathogens in children with acute respiratory infections and apparently healthy controls. *Materials and methods.* Children (97 people) were examined, of which 35 people — with acute respiratory infections of the upper respiratory tract (nasopharyngitis, pharyngitis, laryngitis) (ARI URT), 32 people — with acute respiratory infections of the lower respiratory tract (acute bronchitis, acute obstructive bronchitis) (ARI NDP) and 30 people — apparently healthy control at the time of examination. RNA and DNA of viral and bacterial pathogens were assessed in the oropharyngeal smears using PCR. Test systems produced by the Federal Budgetary Institution Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor and JSC Vector-Best were used. *Results.* An analysis of detection rate for DNA and RNA of bacterial and viral pathogens showed the presence of a wide range of them (20 different species/strains out of 27 identified) in oropharyngeal biomaterial from all examined children. The peak diversity and detection rate of pathogen genomes were found in apparently healthy subjects and children with ARI UDP (DNA of members from Herpesviridae family, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, MSSA, MRCoNS). Associations of 4–6 pathogens prevailed in the microflora, and the “core” of both bacterial and viral-bacterial associations was the combination of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* (in 93.3% and 60.0% of cases, respectively). In bacterial associations, staphylococci (MRSA and MRCoNS) and *P. aeruginosa* were also detected in healthy children, MSSA and other very rarely bacterial types were detected in children with ARI UDP. In children with NPD infections, the majority of whom (75.0±7.7%) were classified as long-term ill and had a complicated disease course, a noticeable depletion (decrease in taxonomic diversity) of the nasopharyngeal microbiota was found. *Conclusion.* The presented data indicate the presence in the biomaterial of the examined children of molecular genetic markers of a wide range of pathogens presented as viral-bacterial and bacterial associations, with varying composition being related to patient clinical status. Detection of pathogen genomes is important for choosing proper etiotropic therapy at early disease stages as well as prescribing probiotic drugs that can restore a balance in respiratory tract microflora.

Key words: microbiome of the respiratory tract, respiratory infections, children, viral pathogens, bacterial pathogens.

Введение

Микрофлора дыхательных путей обеспечивает биологический баланс между организмом и окружающей средой, играя важную роль в поддержании здоровья человека [5, 13]. Защита дыхательных путей от патогенов осуществляется с помощью многих механизмов, включая мукоцилиарный клиренс, факторы врожденного и адаптивного иммунитета, иммуномодулирующее и антагонистическое действие резидентной микрофлоры. Активизация комменсальных бактерий, проникновение из внешней среды патогенов, в том числе вирусной природы, приводит к формированию дисбиоза респираторного тракта [13]. Вирусы способствуют адгезии бактериальных патогенов к клеткам человека и их колонизации за счет разрушения эпителиального барьера, снижения бактериального клиренса, прямого иммуносупрессивного действия [2, 8]. Такая ситуация закономерно может привести к раз-

витию вторичных средних отитов, бактериальных бронхитов и пневмоний, наиболее часто вызываемых *S. pneumoniae* и *S. aureus*, реже — *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa*. В свою очередь увеличение количества этих патогенов во время вирусной инфекции приводит к усилению экспрессии рецепторов адгезии для проникновения вирусов [12, 14]. Формируется патологический замкнутый круг, где дисбиоз поддерживает воспаление, а воспаление — дисбиоз, что приводит к возникновению острых респираторных инфекций, их переходу в хроническую форму и повышению риска развития соматических заболеваний [9].

Острые респираторные инфекции у детей составляют более 70% инфекционной патологии, причем каждый пятый ребенок относится к группе детей с рекуррентными респираторными инфекциями, при которых наблюдается 4–6 и более эпизодов заболевания в год [3, 4]. Для острых респираторных инфекций характерна полиэтиологичность. Благодаря внедрению

в практику молекулярно-генетических методов исследования выявлен широкий спектр «скрытых» респираторных патогенов, не доступных для идентификации в «культуральную» эпоху (вирусы, микоплазмы, хламидии, пневмоцисты и др.). Идентификация некультивируемых и трудно культивируемых представителей респираторной микрофлоры возможна при использовании высокопроизводительных методов секвенирования метагенома микробиоты респираторного тракта, основанных на анализе переменных участков гена 16S рибосомальных РНК. Этот методический подход актуален для научных исследований, в том числе и для внесения новых данных о нуклеотидных последовательностях тех или иных прокариот в соответствующие базы данных. В рутинной практике основным методом молекулярно-генетических исследований для установления этиологии инфекционных заболеваний является ПЦР [12, 20].

Цель исследования — сравнительный анализ частоты обнаружения геномов патогенов дыхательного тракта у детей с острыми респираторными инфекциями и практически здоровых.

Материалы и методы

Обследованы дети: 35 человек — с острыми респираторными инфекциями верхних дыхательных путей (назофарингит, фарингит, ларингит) (ОРИ ВДП), 32 человека — с острыми респираторными инфекциями нижних дыхательных путей (острый бронхит, острый обструктивный бронхит) (ОРИ НДП) и 30 человек — практически здоровых на момент обследования. Все пациенты находились под наблюдением в ГБУ РО «Детская городская поликлиника Железнодорожного района» в г. Ростове-на-Дону и ГБУ РО «Детская городская больница № 1» в г. Ростове-на-Дону в 2021–2022 гг. (в период пандемии новой коронавирусной инфекции). Возраст детей составил 3–15 лет, медиана возраста — 7 лет. Обследование детей проведено в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» в редакции 52-й сессии Генеральной Ассамблеи ВМА (2000 г.) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 г. № 266. На проведение клинического исследования получено добровольное информированное согласие от родителей детей до 15 лет.

У всех детей производили забор отделяемого ротоглотки для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР). Биоматериал помещали в транспортную среду и доставляли в лабораторию в течение 1–2 ч. Для выявления

и количественного определения ДНК вирусов герпеса человека 1 типа (ВГЧ-1) и 2 типа (ВГЧ-2) использовали тест-систему «АмплиСенс HSV 1, II-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); ЭБВ, ЦМВ и ВГЧ-6 — «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»). Для детекции РНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*) использовали тест-систему «АмплиСенс® *Influenza virus A/B-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); для типирования (идентификации субтипов H1N1 и H3N2) вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) — «АмплиСенс *Influenza virus A-тип-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus — hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus — hMpv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus 1–4 — hPiv*), коронавирусов (*human Coronavirus — hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus — hRv*), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus B, C, E — hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus — hBov*) — «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»).

Для выявления и количественного определения ДНК *MSSA* и *MRSA*, *MRCoNS* использовали тест-систему «АмплиСенс *MRSA-скрин-титр-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); ДНК *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae* и *S. pneumoniae* — «АмплиСенс® *N. meningitidis/H influenzae/S. pneumoniae-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); для выявления и количественного определения ДНК *Streptococcus agalactiae* — «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae — скрин-титр-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); *Streptococcus pyogenes* — «АмплиСенс *Streptococcus pyogenes скрин/монитор-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»); ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* — «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и АО «Вектор-Бест»). ДНК *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Stenotrophomonas maltophilia* выявляли методом ПЦР в режиме реального времени с помощью тест-системы (АО «Вектор-Бест»).

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты

При анализе клиническо-анамнестических данных установлено, что большинство обследованных детей как с патологией дыхательных путей (ОРИ НДП и ОРИ ВДП), так и практически здоровых имели неблагоприятный преморбидный фон (отягощенный акушерский анамнез, искусственное вскармливание, перинатальное поражение ЦНС, рекуррентные респираторные инфекции в анамнезе). На долю непривитых и привитых с отклонениями от Национального календаря профилактических прививок пришлось среди всех обследованных 33,3–45,7% пациентов. Осложнения основного заболевания, связанные с поражением лимфоузлов глоточной миндалины 2–3 степени, гипертрофия небных миндалин 2–3 степени, гипертрофия глоточной и небных миндалин 2–3 степени регистрировали у 34,4–50% детей, что не имело достоверных отличий при сравнении детей с заболеваниями дыхательных путей и практически здоровых. Потребность в госпитализации среди пациентов с ОРИ ВДП составила $34,3 \pm 8,0\%$, что достоверно ($p \leq 0,05$) ниже, чем у детей с ОРИ НДП ($87,5 \pm 5,8\%$). Длительность госпитализации более 5 койко-дней у пациентов с ОРИ ВДП ($25,7 \pm 7,4\%$) ниже ($p \leq 0,05$), чем у детей с ОРИ НДП ($53,1 \pm 8,8\%$).

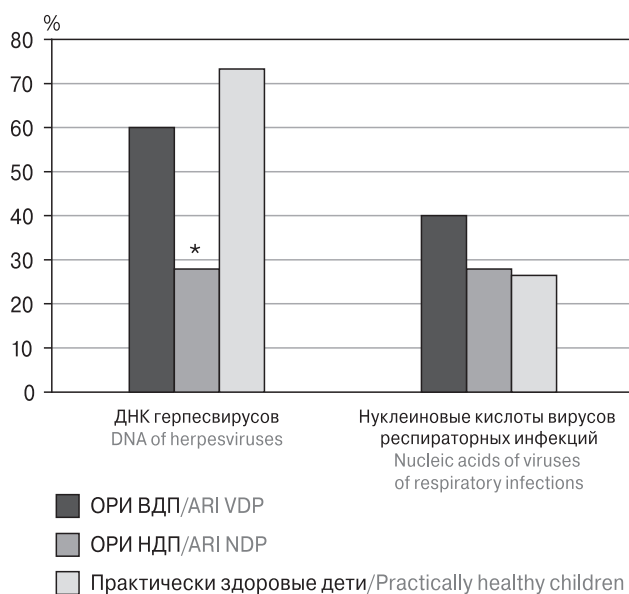


Рисунок. Частота встречаемости геномов герпесвирусов и других респираторных вирусов у детей с ОРИ и практически здоровых

Figure. Rate of detected genomes for herpesviruses and other respiratory viruses in children with ARI and apparently healthy control

Примечание. *Достоверность отличий $p \leq 0,05$.
Note. *Significance of the differences $p \leq 0,05$.

При исследовании частоты встречаемости различных представителей семейства *Herpesviridae* в ПЦР (табл. 1) установлено, что ДНК вируса Эпштейна–Барр на слизистой оболочке ротоглотки обнаруживали реже ($p \leq 0,05$) у детей с заболеваниями дыхательных путей (ОРИ ВДП — $17,1 \pm 6,4\%$, ОРИ НДП — $9,4 \pm 5,2\%$), чем у практически здоровых обследованных ($40,0 \pm 8,9\%$). Другие герпес-вирусы (ЦМВ, ВГЧ-6) выявляли у всех обследованных вне зависимости от диагноза с одинаковой частотой. Примечательно, что ни у одного из пациентов ДНК ВГЧ-1 и ВГЧ-2 в отделяемом ротоглотки не выявлена. При рассмотрении частоты выделения ДНК всех герпесвирусов в целом (рис.) установлено, что реже ($p \leq 0,05$) ее определяли у детей с ОРИ НДП ($28,1\%$ обследованных), чем у детей с ОРИ ВДП ($60,0\%$) и практически здоровых пациентов ($73,3\%$). При определении вирусной нагрузки (количество копий ДНК/мл) никаких достоверных отличий выявить не удалось.

Геномы (РНК, ДНК) вирусов — возбудителей острых респираторных инфекций (гриппа, парагриппа, аденовирусов, респираторно-синтициального вируса, коронавирусов, бокавирусов, метапневмовирусов) представлены у детей с заболеваниями дыхательных путей и практически здоровых обследованных значительно более скудно по сравнению с вирусами герпеса. Так, у детей с ОРИ ВДП только в единичных случаях в биоматериале обнаружены РНК вирусов гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1), парагриппа 1–4, риновируса и ДНК аденовирусов В, С, Е. У детей с ОРИ НДП также в единичных случаях обнаруживали РНК вирусов гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1), риновируса и респираторно-синтициального вируса. Достоверные отличия в частоте выявления геномов этой группы вирусов у детей с заболеваниями дыхательных путей и практически здоровых отсутствуют (рис.).

При рассмотрении частоты выявления геномов бактериальных патогенов на слизистой оболочке ротоглотки установлено, что *S. pneumoniae* являлся доминирующим видом. ДНК *S. pneumoniae* обнаруживали в биоматериале, отобранном у всех практически здоровых детей (100%), в подавляющем большинстве ($91,4 \pm 4,7\%$) у детей с ОРИ ВДП и более чем у половины ($68,8 \pm 8,2\%$) пациентов с ОРИ НДП. Второй по частоте выявления вид *H. influenzae* представлен почти у всех практически здоровых детей ($93,3 \pm 4,6\%$), более чем у половины детей с ОРИ ВДП ($57,1 \pm 8,4\%$) и $21,9 \pm 7,3\%$ пациентов с ОРИ НДП. Следует отметить, что ДНК этих микроорганизмов реже ($p \leq 0,05$) выявляли у больных с ОРИ нижних дыхательных путей, чем верхних. Следующей по значимости группой бактерий явились представители рода *Staphylococcus*:

Таблица 1. Частота встречаемости геномов патогенов у детей с ОРИ и практически здоровых

Table 1. The rate of microbial genome detection in children with ARI

Патогены Pathogens	ОРИ ВДП ARI VDP	ОРИ НДП ARI NDP	Практически здоровые дети Apparently healthy children
ЭБВ EBV	6 17,1±6,4%*	3 9,4±5,2%*	12 40,0±8,9%
ЦМВ CMV	7 20,0±6,8%	3 9,4±5,2%	5 16,7±6,8%
ВГЧ-6 HHV-6	8 22,9±7,1%	3 9,4±5,2%	5 16,7±6,8%
ВГЧ-1 и ВГЧ-2 HSV-1 and HSV-2	–	–	–
Вирус гриппа А(Н3N2) Influenza A(H3N2) virus	2 5,7±3,9%	4 12,5±5,8%	–
Вирус гриппа А(Н1N1) Influenza A(H1N1) virus	1 2,9±2,8%	1 3,1±3,0%	–
Вирус гриппа В Influenza B virus	–	–	–
Вирусы парагриппа 1–4 Parainfluenza viruses 1–4	6 17,1±6,4%	–	–
Бокавирус Bocavirus	–	–	1 3,3±3,3%
Аденовирус (В, С, Е) Adenovirus (B, C, E)	1 2,9±2,8%	–	–
Риновирус Rhinovirus	4 11,4±5,4%	3 9,4±5,2%	7 23,3±7,7%
Респираторно-синцитиальный вирус Respiratory syncytial virus	–	1 3,1±3,0%	–
Метапневмовирус Metapneumovirus	–	–	–
Коронавирус Coronavirus	–	–	–
<i>S. pneumoniae</i>	32 91,4±4,7*,**	22 68,8±8,2%*	30 100%
<i>H. influenzae</i>	20 57,1±8,4%*,**	7 21,9±7,3%*	28 93,3±4,6%
MSSA	8 22,9±7,1%*	3 9,4±5,2%*	14 46,7±9,1%
MRCoNS	10 28,6±7,6%**	1 3,1±3,0%*	7 23,3±7,7%
MRSA	3 8,6±4,7%	–	7 23,3±7,7%
<i>S. agalactiae</i>	1 2,9±2,8%	–	5 16,7±6,8%
<i>S. pyogenes</i>	–	–	3 10,0±5,5%
<i>P. aeruginosa</i>	7 20,0±6,8%*	3 9,4±5,2%	1 3,3±3,3%
<i>K. pneumoniae</i>	2 5,7±3,9%	–	1 3,3±3,3%
<i>A. baumannii</i>	–	1 3,1±3,0%	–

Окончание таблицы 1. Частота встречаемости геномов патогенов у детей с ОРВИ и практически здоровых

Table 1. The rate of microbial genome detection in children with ARI (continued)

Патогены Pathogens	ОРВИ ВДП ARI VDP	ОРВИ НДП ARI NDP	Практически здоровые дети Apparently healthy children
<i>Stenotrophomonas maltophyla</i>	2 5,7±3,9%	–	1 3,3±3,3%
<i>N. meningitidis</i>	–	–	–
<i>M. pneumoniae</i>	–	–	–
<i>C. pneumoniae</i>	–	–	–
Всего обследованных детей Total children examined	35 100%	32 100%	30 100%

Примечание. *Достоверность отличий ($p \leq 0,05$) показателей у детей, с различными формами острой респираторной инфекции по сравнению с аналогичными показателями у практически здоровых детей; **достоверность отличий ($p \leq 0,05$) показателей у детей с ОРВИ ВДП по сравнению с аналогичными показателями у детей с ОРВИ НДП.

Note. *Significance of differences ($p \leq 0,05$) in children with various acute respiratory infection compared with apparently healthy children; **significance of differences ($p \leq 0,05$) in children with ARI of VDP compared with ARI of NDP.

MSSA, MRCoNS и MRSA (в порядке убывания). У детей с заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей ДНК MSSA и MRCoNS выявляли реже ($p \leq 0,05$), чем у практически здоровых обследованных. При этом ДНК MRCoNS чаще ($p \leq 0,05$) обнаруживали у детей с ОРВИ ВДП по сравнению с больными с ОРВИ НДП. ДНК *P. aeruginosa* выявляли у всех обследованных детей, но, по сравнению с практически здоровыми обследованными, чаще ($p \leq 0,05$) у больных с ОРВИ ВДП (20,0±6,8% обследованных). К редко встречаемым патогенам на слизистой оболочке ротоглотки относятся *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *S. maltophyla*. Ни у кого из обследованных детей ДНК факультативных (*N. meningitidis*, *M. pneumoniae*) и облигатных (*C. pneumoniae*) внутриклеточных паразитов не обнаружена.

Микробные ассоциации у детей с ОРВИ ВДП и практически здоровых (табл. 2) представлены, в основном, 4–6 микроорганизмами (60,0±5,9% и 93,3±4,6% пациентов соответственно). У детей с ОРВИ НДП на слизистой оболочке ротоглотки с одинаковой частотой обнаруживали единичные патогены и ассоциации из 2–3 и 4–6 микроорганизмов (21,9±7,3%, 31,3±8,2% и 25,0±7,7% соответственно). При рассмотрении состава ассоциаций установлено, что у всех обследованных вирусно-бактериальные и бактериальные комбинации встречались примерно с одинаковой частотой. У всех обследованных детей *H. influenzae* обнаруживали только в обязательном сочетании с *S. pneumoniae*, тогда как *S. pneumoniae* выявляли в ассоциациях без гемофильной палочки (21,6% случаев).

Таблица 2. Количество микроорганизмов-ассоциантов в отделяемом ротоглотки и слюне у детей

Table 2. The number of oropharyngeal microorganisms isolated in children with ORI

Количество микроорганизмов-ассоциантов Number of associates	ОРВИ ВДП ARI VDP	ОРВИ НДП ARI NDP	Практически здоровые дети Apparently healthy children
1	1 2,9±2,8%**	7 21,9±7,3%*	0
2–3	11 31,4±7,8%*	10 31,3±8,2%*	1 3,3±3,3%
4–6	21 60,0±5,9%*,**	8 25,0±7,7%*	28 93,3±4,6%
7–8	2 5,7±3,9%	–	1 3,3±3,3%
Всего обследованных детей Total children examined	35	32	30

Примечание. *Достоверность отличий ($p \leq 0,05$) показателей у детей с различными формами острой респираторной инфекции по сравнению с аналогичными показателями у практически здоровых детей; **достоверность отличий ($p \leq 0,05$) показателей у детей с ОРВИ ВДП по сравнению с аналогичными показателями у детей с ОРВИ НДП.

Note. *significance of differences ($p \leq 0,05$) in children with various acute respiratory infections compared with apparently healthy children;

**significance of differences ($p \leq 0,05$) in children with ARI of VDP compared with children with ARI of NDP.

Обсуждение

Клиническая симптоматика острых респираторных инфекций у детей с поражением верхних и нижних дыхательных путей во многом определяется микрофлорой, персистирующей на слизистой оболочке респираторного тракта, в том числе микроэкосистемой глоточной миндалины. Анализ частоты выявления ДНК и РНК патогенов бактериальной и вирусной природы свидетельствовал о наличии их широкого спектра (20 различных видов/штаммов из 27 определяемых) в биоматериале из ротоглотки у всех обследованных детей. Однако наибольшим разнообразием и частотой обнаружения геномов патогенов характеризовалась микрофлора дыхательных путей у практически здоровых обследованных и детей с ОРИ ВДП. У этих пациентов чаще ($p \leq 0,05$) выявляли ДНК представителей семейства *Herpesviridae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, MSSA, MRCoNS. При этом в составе микрофлоры на слизистой оболочке ротоглотки у них преобладали ассоциации из 4–6 патогенов (у $93,3 \pm 4,6\%$ практически здоровых детей и $60,0 \pm 5,9\%$ детей с ОРИ ВДП). Иные результаты получены при обследовании детей с инфекциями НДП, у которых обнаружено заметное обеднение микрофлоры дыхательных путей. Следует отметить, что большинство ($75,0 \pm 7,7\%$) пациентов с ОРИ НДП относились к категории длительно болеющих детей и имели осложненное течение заболевания ($50,0 \pm 8,8\%$ обследованных), что, как известно, сопровождается уменьшением таксономического разнообразия назофарингеальной микробиоты [1, 3]. Это может быть обусловлено высокой инвазивной активностью изолятов от детей с ОРИ НДП на фоне формирующихся у них вторичных иммунодефицитных состояний, что позволяет микроорганизмам глубоко проникать в клетки и ткани дыхательных путей. Помимо этого, важное значение имеют и конкурентные взаимоотношения между патогенами и представителями микробиоты респираторного тракта, приводящие к вытеснению многих условно-патогенных микроорганизмов. Такое антагонистическое воздействие может реализовываться за счет продукции патогенами пероксида водорода, ферментов, компонентов клеточной стенки, токсинов, бактериоцинов, а также использования системы кворум-сенсинга [10, 11].

При более подробном анализе состава микробиоты отделяемого ротоглотки установлено, что у детей с ОРИ ВДП и практически здоровых «ядром» как бактериальных, так и вирусно-бактериальных ассоциаций является сочетание *S. pneumoniae* и *H. influenzae* (в $93,3\%$ и $60,0\%$ случаев соответственно). В бактериальных ассоциациях оно дополнено стафилококками (MRSA

и MRCoNS) у здоровых детей и *P. aeruginosa* или MSSA у детей с ОРИ ВДП, очень редко — другими видами бактерий (*S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*). Высокая распространенность пневмококков, вероятно, связана, со способностью стрептококковых нейраминидаз удалять остатки сиаловых кислот с поверхности эпителиальных клеток слизистой оболочки ДП и создавать благоприятные условия для колонизации *S. pneumoniae*. В свою очередь, колонизация *S. pneumoniae* и *S. aureus* приводит к большой плотности заселения респираторного тракта популяцией *H. influenzae*. Об этом свидетельствует обязательное сочетание *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, в то время, как *S. pneumoniae* сравнительно часто встречается в ассоциациях и без гемофильной палочки. Низкая представленность других видов стрептококков (*S. agalactiae*, *S. pyogenes*) у обследованных детей может быть связана с выраженной межвидовой конкуренцией, которая осуществляется посредством комбинаций большого количества бактериоцинов, выделяемых *S. pneumoniae* и кодируемых высоковариабельным опероном *blr*. Подавление *S. pyogenes* может также происходить в результате антагонистического воздействия коагулазо-негативных стафилококков. Некоторые штаммы CoNS способны синтезировать лантибиотик нукацин IVK45, ингибирующий жизнедеятельность пиогенного стрептококка и других представителей микробиоты ДП [1, 6, 7].

Изолированное выделение в ПЦР молекулярно-генетических маркеров патогенов дыхательного тракта из материала, полученного со слизистой оболочки ротоглотки, не позволяет однозначно дифференцировать носительство от заболевания. Выявление ДНК *S. pneumoniae* не дает информации о принадлежности этих микроорганизмов к какому-либо серотипу, вследствие чего невозможно дифференцировать патогенные и условно-патогенные штаммы пневмококков. Однако использование ПЦР поможет внести весомый вклад в проблему изучения некультивируемых микроорганизмов в составе микробиома дыхательных путей человека, а также быстро получить данные о наличии вирусно-бактериальных ассоциаций и закономерностях взаимодействия микроорганизмов друг с другом и с клетками организма-хозяина. Такая информация в сочетании с клинической картиной может оказаться важной для решения вопроса о выборе этиотропной терапии и пробиотических препаратов, особенно у длительно болеющих детей, пациентов с рекуррентными респираторными инфекциями, имеющими неблагоприятный преморбидный фон, в том числе «герпетический» анамнез.

Заключение

Сравнительный анализ частоты обнаружения геномов патогенов дыхательного тракта у детей с острыми респираторными инфекциями и практически здоровых детей свидетельствовал о наибольшем разнообразии и частоте обнаружения геномов микроорганизмов в отделяемом дыхательных путей у детей с ОРИ ВДП и практически здоровых по сравнению с об-

следованными с ОРИ НДП. Учитывая, что выделенные патогены находятся в виде вирусно-бактериальных и бактериальных ассоциаций, состав которых вариабелен и зависит от клинического статуса пациентов, их обнаружение представляется важным для решения вопроса о выборе этиотропной терапии на ранних этапах заболевания, а также назначения пробиотических препаратов, способных восстановить баланс микрофлоры дыхательных путей.

Список литературы/References

1. Абабий И.И., Данилов Л.А., Манюк М.К., Абабий П.И., Гинда С.С., Трофимчук М.Г., Костинов М.П., Поддубиков А.В. Значения микробной флоры ротоглотки в развитии острых и хронических заболеваний верхних дыхательных путей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 359–367. [Ababii I.I., Danilov L.A., Maniuc M.K., Ababii P.I., Ghinda S.S., Trofimciuc M.G., Kostinov M.P., Poddubikov A.V. A role of oropharyngeal microbiota in developing acute and chronic diseases of the upper respiratory tract. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 359–367. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ARO-809
2. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Цитокины — общая система гомеостатической регуляции клеточных функций // Цитология. 2001. Т. 43, № 12. С. 1101–1111. [Vasilieva G.I., Ivanova I.A., Tyukavkina S.Yu. Cytokines as a general system of homeostatic regulation of cell functions. *Tsitologiya = Tsitologiya*, 2001, vol. 43, no. 12, pp. 1101–1111. (In Russ.)]
3. Егорова В.Б., Черкашин М.П., Колмакова А.Ю. Часто болеющие дети: клинические особенности и микробиоценоз верхних дыхательных путей // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки. 2019. № 2. С. 43–47. [Egorova V.B., Cherkashin M.P., Kolmakova A.Y. Children who get sick often: clinical features and microbiological characteristics of upper respiratory ways. *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta imeni M.K. Ammosova = Vestnik of North-Eastern Federal University*, 2019, no. 2, pp. 43–47. (In Russ.)] doi: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31311
4. Каннер Е.В., Горелов А.В. Сочетанные острые респираторные инфекции у детей // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017. № 3. С. 72–77. [Kanner E.V., Gorelov A.V. Combined acute respiratory infections in children. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2017, no. 3, pp. 72–77. (In Russ.)] doi: 10.26442/26586630.2020.1.200082
5. Лопатин А.С., Азизов И.С., Козлов Р.С. Микробиом полости носа и околоносовых пазух в норме и при патологии. Часть I // Российская ринология. 2021. Т. 29, № 1. С. 23–30. [Lopatin A.S., Azizov I.S., Kozlov R.S. Microbiome of the nasal cavity and the paranasal sinuses in health and disease (literature review). Part I. *Rossiiskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2021, vol. 29, no. 1, pp. 23–30. (In Russ.)] doi: 10.17116/rosrino20212901123
6. Старикова Е.В., Галеева Ю.С., Ильина Е.Н. Роль микробиома верхних дыхательных путей в здоровье человека: барьерная функция // Пульмонология. 2022. Т. 32, № 6. С. 876–884. [Starikova E.V., Galeeva Yu.S., Il'ina E.N. The upper respiratory tract microbiome and its role in human health: Barrier function. *Pulmonologiya = Pulmonologiya*, 2022, vol. 32, no. 6, pp. 876–884. (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2022-32-6-876-884
7. Свитич О.А., Нагиева Ф.Г., Курбатова Е.А., Баркова Е.П., Харченко О.С., Строева А.Д., Пашков Е.А., Лисаков А.Н., Грачева А.В., Потапова М.Б., Файзулов Е.Б., Зверев В.В. Вирусингибирующая активность комплекса антигенов условно-патогенных бактерий в отношении коронавируса SARS-CoV-2 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2023. Т. 100, № 2. С. 143–152. [Svitich O.A., Nagieva F.G., Kurbatova E.A., Barkova E.P., Kharchenko O.S., Stroeveva A.D., Pashkov E.A., Lisakov A.N., Gracheva A.V., Potapova M.B., Faizuloev E.B., Zverev V.V. Virus-inhibitory activity of the antigen complex of opportunistic pathogenic bacteria against SARS-CoV-2. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2023, vol. 100, no. 2, pp. 143–152. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-309
8. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Тюкавкина С.Ю. Влияние *Corynebacterium non diphtheriae* на функциональную активность и апоптоз макрофагов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2014. № 6. С. 96–100. [Kharseeva G.G., Voronina N.A., Tyukavkina S.Yu. Effect of *Corynebacterium non diphtheriae* on functional activity and apoptosis of macrophages. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 6, pp. 96–100. (In Russ.)]
9. Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Симбирцев А.С. Особенности микробиома верхних отделов респираторного тракта у детей с рецидивирующими респираторными заболеваниями // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 5. С. 341–349. [Shabal'din A.V., Shabal'dina E.V., Simbirtsev A.S. Features of the microbiome of the upper respiratory tract in children with recurrent respiratory diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 341–349. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-341-349
10. Diaz-Diaz A., Garcia-Maurino C., Jordan-Villegas A., Naples J., Ramilo O., Mejias A. Viral bacterial interactions in children: impact on clinical outcomes. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2019, vol. 38, no. 6S (Suppl. 1), pp. S14–S19. doi: 10.1097/INF.0000000000002319
11. Gupta A., Karyakarte R., Joshi S., Das R., Jani K., Shouche Y., Sharma A. Nasopharyngeal microbiome reveals the prevalence of opportunistic pathogens in SARS-CoV-2 infected individuals and their association with host types. *Microbes. Infect.*, 2022, vol. 24, no. 1: 104880. doi: 10.1016/j.micinf.2021.104880

12. Harrison A.G., Lin T., Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol.*, 2020, vol. 41, no. 12, pp. 1100–1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004
13. Kumpitsch C., Koskinen K., Schöpf V., Moissl-Eichinger C. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biol.*, 2019, vol. 17, no. 1: 87. doi: 10.1186/s12915-019-0703-z
14. Lee K.H., Gordon A., Shedden K., Kuan G., Ng S., Balmaseda A., Foxman B. The respiratory microbiome and susceptibility to influenza virus infection. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 1: e0207898. doi: 10.1371/journal.pone.0207898

Авторы:

Тюкавкина С.Ю., к.м.н., доцент кафедры микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Харсеева Г.Г., д.м.н., проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2 ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Костинов М.П., заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Алиева А.А., к.б.н., ассистент кафедры микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Балахнова В.В., к.м.н., доцент кафедры микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Алутина Э.Л., к.м.н., доцент кафедры микробиологии вирусологии № 2 ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Чайкина В.А., ассистент кафедры детских инфекционных болезней ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Волкова В.В., студентка 6-го курса медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:

Tyukavkina S.Yu., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Kharseeva G.G., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Kostinov M.P., Honored Scientist of the Russian Federation, RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Alieva A.A., PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Balakhnova V.V., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Alutina E.L., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology No. 2 Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Chaikina V.A., Assistant Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Volkova V.V., Graduate Student of the Faculty of Medicine and Prevention, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation.

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ОСНОВНЫХ ТИПОВ И ГЕНОВАРИАНТОВ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР С КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ

М.И. Попкова¹, Е.Н. Филатова¹, С.В. Минаева², Н.А. Сахарнов¹, О.В. Уткин¹

¹ ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

² ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. *Введение.* У людей, живущих с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), чаще наблюдается реактивация вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и развитие ВЭБ-ассоциированных заболеваний. В России изучение клинической значимости генетического разнообразия ВЭБ у ВИЧ-инфицированных пациентов не проводилось. Цель исследования — оценка взаимосвязи основных типов ВЭБ и геновариантов *LMP-1* с клинико-лабораторными показателями у ВИЧ-инфицированных взрослых. *Материалы и методы.* Исследованы лейкоциты крови 138 ВИЧ-инфицированных в возрасте 20–69 лет. Для дифференциальной детекции типов ВЭБ-1 и ВЭБ-2 применялся метод ПЦР. Определение нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* выполнено методом секвенирования по Сэнгеру. Биоинформационный анализ данных проводили с помощью программного обеспечения MEGA X. Для поиска взаимосвязи типов ВЭБ, вариантов и субвариантов *LMP-1* данного вируса с клинико-лабораторными показателями (количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, вирусная нагрузка ВИЧ, вирусная нагрузка ВЭБ, применение и приверженность антиретровирусной терапии (АРТ)) использован метод главных компонент и U-тест Манна–Уитни. *Результаты.* Показано, что определяемый уровень вирусной нагрузки ВИЧ возрастает у пациентов с низким содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов, высокой вирусной нагрузкой ВЭБ, низкой приверженностью АРТ или в ее отсутствие. В целом, при инфицировании только ВЭБ-2 или вариантом *LMP-1 B95-8* вирусная нагрузка ВЭБ и ВИЧ была меньше по сравнению с другими вариантами вируса. Выявлены значимые субварианты *LMP-1 ВЭБ-1*, биологический потенциал которых реализовался в условиях иммунодефицита (количество CD4⁺ Т-лимфоцитов ≤ 200 клеток/мкл). При этом у «наивных» пациентов коинфекция ВЭБ-1/*LMP-1(S309N)*+ВИЧ протекала с более высокой, а ВЭБ-1/*LMP-1(E328Q)*+ВИЧ — с наименьшей вирусной нагрузкой ВИЧ. Наиболее высокий уровень ДНК ВЭБ у этих пациентов наблюдался при молекулярно-генетическом профиле ВЭБ-1/*LMP-1(Q334R)*+ВИЧ. В группе «опытных» пациентов концентрация ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови была значительно ниже при инфицировании ВЭБ-1/*LMP-1(E328Q)*+ВИЧ и, наоборот, выше, в тех случаях, когда выявляли ВЭБ-1/*LMP-1(H358P)*+ВИЧ. *Заключение.* Впервые в России выявлены

Адрес для переписки:

Попкова Мария Игоревна
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (раб.), 8 906 352-60-15 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Для цитирования:

Попкова М.И., Филатова Е.Н., Минаева С.В., Сахарнов Н.А., Уткин О.В.
Оценка взаимосвязи основных типов и геновариантов вируса
Эпштейна–Барр с клинико-лабораторными показателями у ВИЧ-
инфицированных взрослых // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5.
С. 936–950. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-17623

© Попкова М.И. и соавт., 2024

Contacts:

Mariia I. Popkova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office), +7 906 352-60-15 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Citation:

Popkova M.I., Filatova E.N., Minaeva S.V., Sakharov N.A., Utkin O.V.
Assessment of the relationship between Epstein–Barr virus major types and
genovariants as well as clinical and laboratory parameters in HIV-infected
adults // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i
mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 936–950. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-17623

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOT-17623>

особенности клинико-лабораторных показателей ВЭБ+ВИЧ-коинфекции при инфицировании разными субвариантами LMP-1 ВЭБ-1 (на уровне аминокислотных замен S309N, E328Q, Q334R, H358P). Необходимо изучение функциональной роли выявленных мутаций *in vitro* и *in vivo*. В контексте изучения клинической значимости молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ целесообразно проведение более масштабных исследований на разных территориях России.

Ключевые слова: ВЭБ-1, ВЭБ-2, LMP-1, ВИЧ-инфекция, секвенирование, ПЦР.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN EPSTEIN–BARR VIRUS MAJOR TYPES AND GENOVARIENTS AS WELL AS CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN HIV-INFECTED ADULTS

Popkova M.I.^a, Filatova E.N.^a, Minaeva S.V.^b, Sakharnov N.A.^a, Utkin O.V.^a

^a Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Privolzhskiy Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Introduction. People living with human immunodeficiency virus (HIV) are more likely to experience Epstein–Barr virus (EBV) reactivation and develop EBV-associated diseases. In Russia, the clinical significance of EBV genetic diversity in HIV-infected patients has not been assessed. The aim was to analyze a relationship between the major EBV types and LMP-1 genovariants with clinical and laboratory parameters in HIV-infected persons. **Materials and methods.** Peripheral blood leukocytes were collected from 138 HIV(+) individuals aged 20–69 years. Association between EBV types, LMP-1 variants and subvariants with clinical and laboratory parameters (CD4⁺ T-lymphocyte count, HIV and EBV viral load, use and adherence to antiretroviral therapy (ART)), was performed using the principal component analysis method and the Mann–Whitney U test. **Results.** It has been shown that detectable HIV viral load increases in patients with low CD4⁺ T-lymphocyte counts, high EBV viral load, and low or no ART adherence. In general, infection with EBV-2 or the LMP-1 B95- δ alone resulted in lower EBV and HIV viral loads compared with other variants. Significant EBV-1 LMP-1 subvariants were identified, the biological potential of which was enabled in immunodeficiency state (CD4⁺ T-lymphocyte count \leq 200 cells/ μ l). In “naive” patients, EBV-1/LMP-1 (S309N)+HIV co-infection occurred with a higher, and EBV-1/LMP-1(E328Q)+HIV with the lowest HIV viral load. The highest EBV DNA concentrations were observed with EBV-1/LMP-1(Q334R)+HIV. In “experienced” patients, the level of EBV DNA was significantly lower when infected with EBV-1/LMP-1(E328Q)+HIV and, conversely, higher in case of detected EBV-1/LMP-1(H358P)+HIV. **Conclusion.** The features of clinical and laboratory parameters EBV+HIV co-infection caused by different EBV-1 LMP-1 subvariants (at the level of amino acid substitutions S309N, E328Q, Q334R, H358P) have been identified. It is necessary to study the functional role of such mutations *in vitro* and *in vivo*. In the context of assessing a clinical significance of EBV molecular genetic diversity, it is advisable to conduct larger-scale studies in different territories of Russia.

Key words: EBV-1, EBV-2, LMP-1, HIV infection, sequencing, PCR.

Введение

В настоящее время во всем мире инфицированность взрослого населения *Human gammaherpesvirus 4*, известным как вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), составляет более 90%. Первичное инфицирование ВЭБ происходит в раннем детском или подростковом возрасте. При этом у иммунокомпетентных лиц в 60–80% случаев наблюдается бессимптомная сероконверсия, реже развивается острая форма ВЭБ-инфекции — инфекционный мононуклеоз (ИМ). Впоследствии человек пожизненно остается вирусоносителем ВЭБ [3]. Однако у иммунокомпрометированных лиц ВЭБ-инфекция протекает с более выраженными клиническими проявлениями и осложнениями [1, 2, 9, 23, 35].

Большинство взрослых людей, которые заражаются ВИЧ, уже инфицированы ВЭБ [23, 45, 49]. Клинические наблюдения зарубежных и российских специалистов свидетельствуют о том, что у людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), учащаются и продлеваются эпизоды реактивации ВЭБ, что может существенно влиять на показатели заболеваемости и смертности [2, 23, 31]. ВЭБ-инфекция, включая ИМ, выявляется у 38% амбулаторных ВИЧ-инфицированных пациентов [1]. Для сравнения: у здоровых доноров крови серологические маркеры реактивации ВЭБ-инфекции обнаруживаются с частотой 13% [22]. ВЭБ рассматривается как кофактор прогрессирования ВИЧ-инфекции. В общем, коинфицирование ВЭБ+ВИЧ может приводить к развитию хронической активной ВЭБ-инфекции, волосатой лейкоплакии, лимфоид-

ным интерстициальным пневмонитам, нейроинфекции и широкому спектру злокачественных новообразований [2, 9, 32].

Несмотря на успехи антиретровирусной терапии (АРТ), прогнозы специалистов сводятся к тому, что эпидемический потенциал ВИЧ-инфекции на фоне увеличения продолжительности жизни пациентов будет сопровождаться ростом числа случаев выявления ВЭБ-ассоциированных опухолей, что требует продолжения междисциплинарных исследований в контексте данной проблемы [9, 19, 27, 28, 42, 45]. Среди наиболее значимых онкогенов, участвующих в вирусной кооперации, отмечают связанные с ВИЧ-1 гены *Tat* и *Vpr* и гены ВЭБ — *LMP-1* и *EBNA-2* [19].

Механизмы взаимодействия ВЭБ и ВИЧ при коинфекции остаются мало изученными. Относительно недавно были получены первые данные об иммунологическом профиле ВИЧ-инфицированных в зависимости от инфицирующего типа ВЭБ — ВЭБ-1 и ВЭБ-2, которые различают на основе генов ядерного антигена 2 и 3 (*EBNA-2*, *EBNA-3*). У ВИЧ-инфицированных ВЭБ-1 был ассоциирован с меньшим количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов и высокой вирусной нагрузкой ВИЧ, в то время как ВЭБ-2 чаще встречался при уровне $CD4^+$ Т-лимфоцитов ≥ 500 клеток/мкл и низкой вирусной нагрузке ВИЧ [35, 40]. Имеются сведения, что отсутствие или позднее начало АРТ у ВИЧ-инфицированных пациентов повышает риск коинфекции ВЭБ-1+ВЭБ-2 и развитие симптомов заболевания [34, 36]. Пока единственная работа о распространенности вариантов ВЭБ при ВИЧ-инфекции в контексте наиболее популярной классификации R. Edwards и соавт. [20], основанной на полиморфизме С-концевой области гена латентного мембранного белка 1 (*LMP-1*), опубликована в мае 2023 г. [43].

В России исследования молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ во взаимосвязи с клинико-лабораторными показателями у ЛЖВ до сих пор не проводились. Расширение знаний о патогенезе ВЭБ на молекулярном уровне лежит в основе перспективной разработки методов специфической профилактики, диагностики и терапии ВЭБ-ассоциированных заболеваний у пациентов с ВИЧ/СПИД [27].

Цель исследования — оценка взаимосвязи основных типов ВЭБ и геновариантов *LMP-1* с клинико-лабораторными показателями у ВИЧ-инфицированных взрослых.

Материалы и методы

Характеристика групп исследования. Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 138 ВИЧ-инфицированных паци-

ентов в возрасте 20–69 лет, которые находились на диспансерном наблюдении в ГБУЗНО «НОЦ СПИД» (г. Нижний Новгород) (группа ВИЧ(+)).

Группы сравнения. Сформированы группы сравнения ВИЧ(+) пациентов на основе комбинации данных о степени иммунных нарушений (по классификации ВОЗ [46]) и антиретровирусной терапии (АРТ): «наивные» пациенты (без АРТ), $CD4^+$ Т-лимфоциты < 200 клеток/мкл (группа G1, n = 30); «наивные» пациенты (без АРТ), $CD4^+$ Т-лимфоциты > 500 клеток/мкл (группа G2, n = 20); «опытные» пациенты (получающие АРТ в среднем 36 месяцев), $CD4^+$ Т-лимфоциты < 200 клеток/мкл (группа G3, n = 43); «опытные» пациенты (получающие АРТ в среднем 36 месяцев), $CD4^+$ Т-лимфоциты > 500 клеток/мкл (группа G4, n = 45).

«Наивные» пациенты были обследованы перед началом АРТ (Z, n = 50).

«Опытных» пациентов (n = 88) различали по степени приверженности АРТ: высокая (H, n = 55), средняя (M, n = 5), низкая (L, n = 28).

Соблюдение этических требований. Работа проводилась с деперсонализированными данными пациентов. Информированное согласие пациентов на проведение исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинской организации. Работа получила одобрение на заседании локального этического комитета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Протокол № 3 от 11.11.2021 г.).

Анализ клинико-лабораторных показателей каждого пациента (пол, возраст, приверженность АРТ, результаты проточной цитофлуориметрии, ИФА, иммуноблоттинга и ПЦР для определения маркеров ВИЧ-инфекции) проведен ретроспективно на основе данных медицинской документации. Для количественной оценки $CD4^+$ Т-лимфоцитов использовали проточный цитофлуориметр BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Вирусную нагрузку ВИЧ определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью тест-системы «РеалБест РНК ВИЧ количественный» (АО «Вектор-Бест», Россия). Рекомендуемый производителем тест-системы порог определяемой вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови составляет 58 копий/мл.

ПЦР-исследования и секвенирование по Сэнгеру ДНК ВЭБ проводились в лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Сбор биологического материала. Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная K_3 ЭДТА.

Для получения фракции лейкоцитов крови использовали реагент «Гемолитик» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение ДНК ВЭБ. Выделение тотальной нуклеиновой кислоты проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ выполняли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) на амплификаторе «Rotor-Gene Q 5plex HRM» (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол на всех этапах ПЦР-РВ соблюдали согласно инструкции производителя.

Дифференциальная детекция ВЭБ-1 и ВЭБ-2 методом ПЦР. Для раздельной детекции основных типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) применен оптимизированный нами ранее вариант однораундовой ПЦР на основе гена *EBNA-2* [5].

ПЦР-анализ и секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ. Положительные образцы, содержащие ДНК ВЭБ (по результатам ПЦР-РВ), были использованы для амплификации С-концевого фрагмента гена *LMP-1* вируса методом ПЦР в оптимизированном нами однораундовом варианте исполнения [6]. Лабораторный протокол последующего секвенирования по Сэнгеру фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ описан нами ранее [6].

Биоинформационный анализ. Биоинформационный анализ данных проводился с помощью открытого программного обеспечения MEGA X (Mega Software, США)¹ и языка программирования R, версия 2022.12.0+353 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc)². Полученные исходные нуклеотидные последовательности выравнивались по алгоритму ClustalW. В качестве референсных последовательностей служили полученные из базы данных GenBank³ полногеномные последовательности прототипного штамма *B95-8* (V01555.1), а также нуклеотидные последовательности гена *LMP-1* — штаммы *China 1* (AY337723.1), *China 2* (AY337724.1), *Med-* (AY337721.2), *Med+* (AY337722.2), *NC* (AY337726.2), *Alaskan* (AY337725.1), *CAO* (X58140.1) и *AG876* (DQ279927.1). Нуклеотидные последовательности исследуемых изолятов ВЭБ и референсные последовательности транслировались в аминокислотные по стандартному генетическому коду. Принадлежность исследуемых последо-

вательностей LMP-1 к определенным вариантам в рамках классификации R. Edwards и соавт. устанавливалась по наличию сигнатурных аминокислотных замен (согласно табл. 1 в [20]). Предполагаемые рекомбинантные последовательности (*rec*) анализировали с помощью программного обеспечения 3SEQ (BoniLab, Вьетнам—США). Использовали длину окна 200 п.н. и шаг 10 п.н. Статистическую значимость вероятных рекомбинационных событий оценивали с применением непараметрического мозаичного теста.

Полученные нуклеотидные последовательности 82 нижегородских изолятов ВЭБ из лейкоцитов крови ВИЧ-инфицированных взрослых депонированы в международную базу данных GenBank: номера доступа OR862230-OR862311 (присвоены 12.12.2023).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием языка программирования R и среды RStudio, версия 2022.12.0+353 (RStudio, RBC)^{2,4}. Принадлежность выборок к нормальному распределению определяли с помощью критерия Шапиро—Уилка и графиков квантилей. Для попарного сравнения независимых выборок использован критерий Манна—Уитни. Полученное количество ДНК/РНК и клеток представляли в виде Me [Q1; Q3] (где Me — медиана, Q1, Q3 — первый и третий квартили). Долю описывали с указанием стандартного отклонения процентной доли ($P \pm \sigma_p$), в %. Оценку различий относительных показателей в анализируемых группах проводили с применением критерия χ^2 (хи-квадрат) с поправкой Йетса и критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Оценку возможного влияния ВЭБ-инфекции на клинико-лабораторные показатели у ВИЧ-инфицированных проводили с использованием метода главных компонент (РСА-анализ). Анализировали распределение ВИЧ(+) пациентов в координатах первых двух главных компонент (ГК) в зависимости от вирусной нагрузки ВЭБ, содержания CD4⁺ Т-лимфоцитов и приверженности пациентов АРТ. При этом приверженность терапии выражали в числовых значениях от 0 до 1, где 0 — без АРТ, 1 — высокая приверженность. Вклад переменных в состав компонент оценивали по показателю корреляции вектора переменной и осью компоненты. Возможные факторы группировки пациентов в координатах двух первых измерений выявляли методом визуального наложения. Для количественной оценки строили линейную модель

¹ URL: <https://www.megasoftware.net>

² URL: <https://www.Rproject.org>

³ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

⁴ URL: <http://www.rstudio.com>

Таблица 1. Корреляция анализируемых переменных и осей компонент

Table 1. The correlation between analyzed variables and component axes

Характеристика группы ВИЧ(+) HIV(+) group characteristics	n	Анализируемые переменные Analyzed variables	ГК 1 PC 1	ГК 2 PC 2
Всего Total	138	Приверженность к терапии Adherence to ART	0,57	0,62
		CD4⁺ Т-лимфоциты, клеток/мкл CD4 ⁺ T-lymphocytes, cells/ μ l	0,64	0,09
		ДНК ВЭБ, $\times 10^5$ копий/10^5 клеток EBV DNA, $\times 10^5$ copies/ 10^5 cells	-0,52	0,78
С установленным типом ВЭБ With verified EBV type	97	Приверженность АРТ Adherence to ART	0,53	0,75
		CD4⁺ Т-лимфоциты, клеток/мкл CD4 ⁺ T-lymphocytes, cells/ μ l	0,64	-0,05
		ДНК ВЭБ, $\times 10^5$ копий/10^5 клеток EBV DNA, $\times 10^5$ copies/ 10^5 cells	-0,56	0,66
С установленным вариантом LMP-1 ВЭБ With verified EBV LMP-1 variant	82	Приверженность АРТ Adherence to ART	0,55	0,74
		CD4⁺ Т-лимфоциты, клеток/мкл CD4 ⁺ T-lymphocytes, cells/ μ l	0,62	-0,04
		ДНК ВЭБ, $\times 10^5$ копий/10^5 клеток EBV DNA, $\times 10^5$ copies/ 10^5 cells	-0,56	0,67

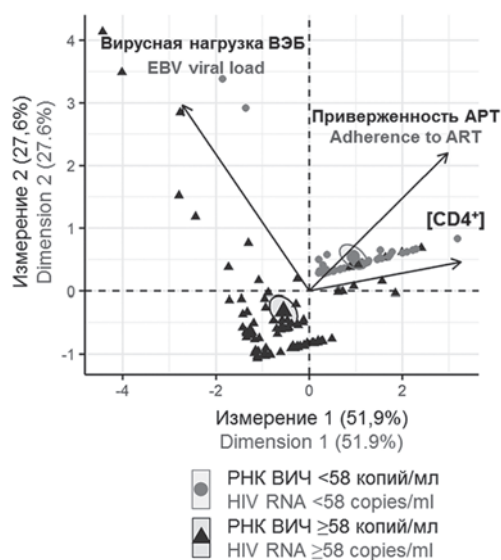


Рисунок 1. Расположение точек ВИЧ(+) пациентов в координатах двух первых главных компонент с визуальным наложением фактора выявления РНК ВИЧ выше или ниже определяемого уровня

Figure 1. Location of HIV(+) patient points in the coordinates of the first two principal components with a visual overlay of the HIV RNA detection factor above or below the detectable level

Примечание. Эллипс отображает 95%-й доверительный интервал расположения барицентра групп. Стрелками обозначены вектора изученных переменных.

Note. The ellipse displays the 95% confidence interval of the barycenter location of the groups. The arrows indicate the vectors of the studied variables.

зависимости возможных факторов группировки от переменных со значительным вкладом в состав первых двух главных компонент.

Оценивали вирусную нагрузку ВЭБ и ВИЧ, количество CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ(+) пациентов в зависимости от типа, варианта и субварианта ВЭБ. Для анализа отбирались субварианты, достаточно широко представленные среди обследованных пациентов (n \geq 3). Использовали U-тест Манна–Уитни. Рассчитанные значения «р» корректировали с применением поправки Холма–Бонферрони для множественных сравнений. Различия описывали с указанием Δ (ДИ: CI.l — CI.ul) и уровня статистической значимости (р), где Δ — разница положений распределений, CI.l и CI.ul — нижняя и верхняя границы 95%-ного доверительного интервала (ДИ) разницы. Различия считали статистически значимыми при скорректированном $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе исследования все полученные образцы лейкоцитов крови тестировались с помощью количественной ПЦР-РВ. ДНК ВЭБ была обнаружена у 70,3 \pm 3,9% ВИЧ(+) пациентов, при этом вирусная нагрузка составила 18 [5; 139] копий/ 10^5 клеток.

Последующий РСА-анализ позволил охарактеризовать зависимость между вирусной нагрузкой ВЭБ, вирусной нагрузкой ВИЧ, количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов и приверженностью АРТ. При анализе всех ВИЧ(+) пациен-

тов удалось установить их распределение в координатах двух первых компонент, суммарно объяснявших 79,5% дисперсии. Анализируемые переменные вносили различный вклад в состав главных компонент (табл. 1).

Выявлено, что в отношении первой компоненты вклад вирусной нагрузки ВЭБ сопоставим, но противопоставлен вкладу содержания CD4⁺ Т-лимфоцитов и приверженности терапии. В состав второй компоненты основной вклад внесли такие переменные как вирусная нагрузка ВЭБ и приверженность терапии, их вклад был сопоставим и однонаправлен.

Для оценки возможного значения главных компонент мы провели визуальное наложение фактора вирусной нагрузки ВИЧ на точки расположения ВИЧ(+) пациентов в координатах двух первых измерений (рис. 1).

На графике барицентры двух групп располагались на выраженном удалении друг от друга в первом и третьем квадрантах. Исходя из этого можно предположить, что ось первой компоненты в большей степени отражала вирусную нагрузку ВИЧ у пациентов, в то время как ось второй компоненты — их приверженность терапии. Интересно отметить, что параметр вирусной нагрузки ВЭБ вносил равноценный вклад в формирование как первой, так и второй главных компонент.

Кроме того, все исследованные нами переменные оказывали влияние на риск определяемой вирусной нагрузки ВИЧ. Так у пациентов с низкой приверженностью терапии, низким содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов и высокой вирусной нагрузкой ВЭБ риск выявления РНК ВИЧ выше 58 копий/мл возрастал, и наоборот.

Для количественной оценки зависимости возможных факторов группировки от переменных со значительным вкладом в состав первых двух главных компонент была построена линейная модель:

$$[HIV] = 516103 + 114 \times [EBV] - 339 \times [CD4^+_{abs}] - 331575 \times \text{ther.code} (1/0),$$

где [HIV] — вирусная нагрузка ВИЧ (копии/мл); [EBV] — вирусная нагрузка ВЭБ (копии/10⁵ клеток); [CD4⁺_abs] — абсолютное количество CD4⁺ Т-лимфоцитов (клеток/мкл); ther.code (1/0) — высокая приверженность АРТ (есть/нет).

Используя данную модель, показано, что вирусная нагрузка ВИЧ увеличивалась на 114±58 копий/мл при повышении количества ДНК ВЭБ на 1 копию/10⁵ клеток (p = 0,049) или на 339±165 копий/мл при снижении CD4⁺ Т-лимфоцитов на одну клетку (p = 0,042). Наоборот, концентрация РНК ВИЧ значительно снижалась (на 331 575±123 452 копий/мл), если у пациентов была высокая приверженность АРТ (p = 0,008).

Отметим, что небольшое значение коэффициента R² при высоком уровне значимости (R² = 0,156, p < 0,001) свидетельствует о том, что помимо исследованных нами переменных в показатель вирусной нагрузки ВИЧ вносят вклад и другие факторы.

На следующем этапе работы нами осуществлен анализ взаимосвязи молекулярно-генетических особенностей ВЭБ с уровнем вирусной нагрузки ВИЧ, количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов и степенью приверженности АРТ у ВИЧ(+) пациентов. Анализ проводили по трем направлениям: типы ВЭБ, варианты и субварианты LMP-1 ВЭБ.

По результатам дифференциальной детекции ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у ВИЧ(+) пациентов была получена следующая типовая структура изолятов: ВЭБ-1 — 88,2±3,4%, ВЭБ-2 — 5,4±2,3%, коинфекция ВЭБ-1+ВЭБ-2 — 6,4±2,6%. Также определена штаммовая принадлежность полученных нижегородских изолятов ВЭБ по классификации R. Edwards и соавт. [20]. Доминирующим вариантом LMP-1 ВЭБ у ВИЧ(+) пациентов являлся B95-8 (62,2±5,4%), реже встречались NC (15,5±4,0%), Med- (11,9±3,6%), China 1 (4,8±2,3%), Alaskan (2,4±1,7%) и рекомбинантные варианты rec (2,4±1,7%).

Для изучения возможного влияния типа ВЭБ и варианта LMP-1 на состояние ВИЧ-инфицированных, повторили процедуру РСА-анализа для пациентов с установленным типом ВЭБ и установленным вариантом LMP-1 (табл. 1 и рис. 2). В связи с выявленной ранее более высокой дивергентностью последовательностей LMP-1 вариантов Med-, NC, Alaskan и China 1, пациенты были сгруппированы по принципу «вариант B95-8 — другие варианты» [6, 10].

Из табл. 1 и рис. 2 видно, что распределение пациентов с охарактеризованным ВЭБ в координатах двух главных компонент было сопоставимо таковому для всех ВИЧ(+) пациентов. Анализируемые переменные вносили сопоставимый вклад в состав компонент, а именно: ось первой компоненты в большей степени отражала вирусную нагрузку ВИЧ у пациентов, ось второй компоненты — их приверженность терапии, параметр вирусной нагрузки ВЭБ вносил равноценный вклад в формирование как первой, так и второй главных компонент.

Выявлено расхождение барицентров групп пациентов в зависимости от типа ВЭБ (рис. 2А) и/или варианта LMP-1 ВЭБ (рис. 2Б). При этом в обоих случаях расхождение наблюдали вдоль вектора переменной вирусной нагрузки ВЭБ. Можно предположить, что тип и вариант ВЭБ оказывают влияние на вирусную нагрузку ВЭБ и, косвенно, на вирусную нагрузку ВИЧ у ВИЧ(+) пациентов. Исходя из полученных данных, следует ожидать, что у ВИЧ(+)

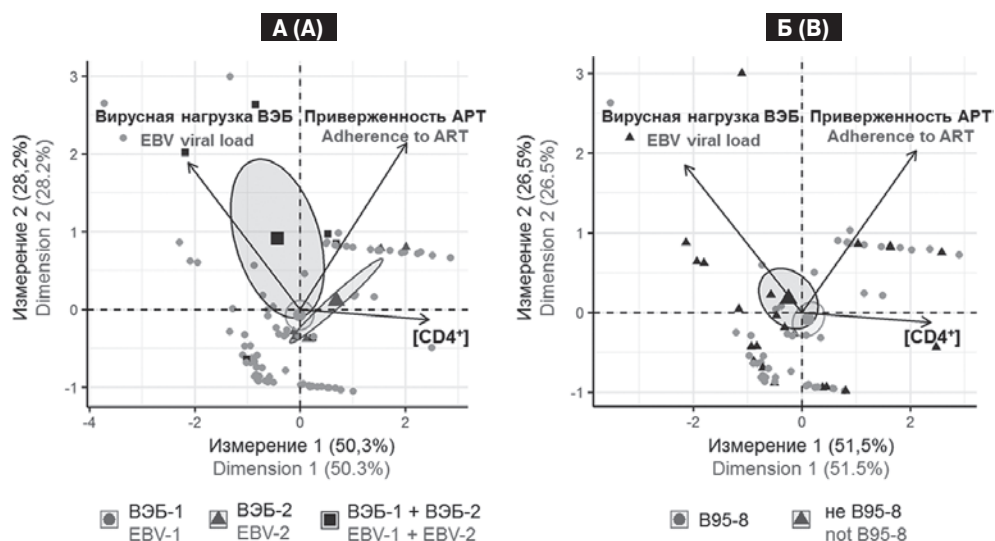


Рисунок 2. Расположение точек ВИЧ(+) пациентов в координатах двух первых главных компонент с визуальным наложением фактора: А — типа ВЭБ, Б — варианта LMP-1 ВЭБ

Figure 2. Location of HIV(+) patient points in the coordinates of the first two principal components with visual overlay of the factor: A — EBV type, B — EBV LMP-1 variant

Примечание. Эллипс отображает 95%-й доверительный интервал расположения барического центра групп. Стрелками обозначены вектора изученных переменных.

Note. The ellipse displays the 95% confidence interval of the barycenter location of the groups. The arrows indicate the vectors of the studied variables.

пациентов с сопоставимым уровнем $CD4^+$ Т-лимфоцитов и одинаковой приверженностью АРТ вирусная нагрузка ВЭБ (а, следовательно, и вирусная нагрузка ВИЧ) при коинфицировании обоими типами ВЭБ (ВЭБ-1+ВЭБ-2) будет выше, а у пациентов, инфицированных ВЭБ-2, наоборот, ниже по сравнению с теми, у кого выявлен ВЭБ-1. У пациентов с вариантом LMP-1 B95-8 вирусная нагрузка ВЭБ (и ВИЧ) будет ожидаемо ниже по сравнению с пациентами с иными вариантами вируса.

Последующий анализ с использованием классических методов статистики не позволил получить статистически значимые различия уровня вирусной нагрузки ВЭБ, вирусной нагрузки ВИЧ и количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов между пациентами, инфицированными разными типами и вариантами ВЭБ, как в группе ВИЧ(+) в целом, так и в разрезе отдельных групп сравнения. Исходя из полученных данных, мы предполагали, что выраженность клинико-лабораторных проявлений ВИЧ-инфекции может быть обусловлена прочими генетическими особенностями ВЭБ, а именно наличием повторов, делеций и аминокислотных замен в LMP-1, обозначенных нами как субварианты.

Для подтверждения данной гипотезы среди всех выявленных в данном исследовании молекулярно-генетических характеристик С-концевой области LMP-1 ВЭБ отобрали те, которые были представлены у пациентов в достаточном количестве (3 и более случаев) (табл. 2). По ти-

повой принадлежности все сгенерированные субварианты LMP-1 были представлены только ВЭБ-1. Анализ выполнен дифференцированно в группах G1, G2, G3 и G4, учитывая иммунный, АРТ-статус пациентов и их влияние на анализируемые показатели (табл. 3).

В результате установлено, что существуют субварианты LMP-1 ВЭБ-1 с определенными молекулярно-генетическими признаками (на уровне аминокислотных замен), которые ассоциированы с изменением количества РНК ВИЧ и ДНК ВЭБ по сравнению с пациентами, инфицированными другими геновариантами (табл. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что клинико-лабораторные особенности ВЭБ+ ВИЧ-коинфекции при инфицировании разными субвариантами LMP-1 ВЭБ проявляются только у пациентов с выраженным иммунодефицитом при количестве $CD4^+$ Т-лимфоцитов < 200 клеток/мкл (группы G1 и G3). В группах ВИЧ(+) пациентов, у которых $CD4^+$ Т-лимфоциты были > 500 клеток/мкл (G2 и G4) взаимосвязь анализируемых клинико-лабораторных показателей с инфицирующим субвариантом LMP-1 ВЭБ не выявлена.

Установлено, что у «наивных» пациентов в группе G1 субвариант S309N (был представлен в 100% последовательностей LMP-1 China I, Med-, NC, Alaskan и rec) был ассоциирован с более высокими значениями концентрации РНК ВИЧ в плазме крови. Напротив, при ин-

фицировании субвариантом *E328Q* (установлен исключительно в изолятах *B95-8*) в этой же группе ВИЧ-инфицированных были понижены уровни вирусной нагрузки ВИЧ по сравнению с теми, у кого в последовательностях LMP-1 данная мутация отсутствовала. Обнаружение субварианта *Q334R* (специфическая мутация для вариантов LMP-1 *China 1* и *Med-*) характеризовалось значительно более высокими уровнями вирусной нагрузки ВЭБ.

У «опытных» пациентов в группе G3 была выявлена связь отдельных субвариантов только с вирусной нагрузкой ВЭБ. При этом уровни

вирусной нагрузки ВЭБ были ниже при инфицировании субвариантом *E328Q* и, наоборот, выше, если выявлялся субвариант *H358P* (типичная аминокислотная замена в штаммах *NC*). Дополнительно отметим, что именно изоляты *NC* ВЭБ-1 из лейкоцитов крови ВИЧ(+) лиц продемонстрировали наибольшую дивергентность С-концевой области LMP-1 по сравнению со всеми другими вариантами. В последовательностях *NC* присутствовало в среднем на 2, 5 и 9 мутаций больше, чем в вариантах *Med-*, *China 1* и *B95-8* соответственно ($p < 0,01$ для каждого варианта сравнения).

Таблица 2. Проанализированные субварианты LMP-1 ВЭБ

Table 2. Analyzed EBV LMP-1 subvariants

Субвариант LMP-1 ВЭБ EBV LMP-1 subvariant	Частота среди всех изолятов ВЭБ Frequency among all EBV isolates	Частота среди выявленных вариантов LMP-1 ВЭБ Frequency among identified EBV LMP-1 variants
346_del10_355	4/82	<i>China 1</i> (4/4)
4*[PQDPDNTDDNG] 2*[PHDPL]	43/82	<i>B95-8</i> (43/51)
3*[PQDPDNTDDNG] 2*[PQGPDNTDDNG] 1*[PHDPL]	3/82	<i>Med-</i> (3/10)
3*[PQDPDNTDDNG] 1*[PHDPQ]	7/82	<i>NC</i> (7/13)
4*[PQDPDNTDDNG] 1*[PHDPQ]	4/82	<i>NC</i> (3/13), <i>rec</i> (1/2)
G212S	72/82	<i>Alaskan</i> (2/2), <i>B95-8</i> (47/51), <i>China 1</i> (3/4), <i>Med-</i> (10/10), <i>NC</i> (9/13), <i>rec</i> (1/2)
D216H	3/82	<i>B95-8</i> (2/51), <i>China 1</i> (1/4)
S229T	11/82	<i>B95-8</i> (1/51), <i>Med-</i> (10/10)
D250N	13/82	<i>NC</i> (13/13)
G252A	5/82	<i>Med-</i> (3/10), <i>rec</i> (2/2)
L306Q	14/82	<i>NC</i> (13/13), <i>rec</i> (1/2)
S309N	31/82	<i>Alaskan</i> (2/2), <i>China 1</i> (4/4), <i>Med-</i> (10/10), <i>NC</i> (13/13), <i>rec</i> (2/2)
S313P	14/82	<i>B95-8</i> (1/51), <i>NC</i> (13/13)
Q322E	10/82	<i>Med-</i> (9/10), <i>rec</i> (1/2)
Q322N	4/82	<i>China 1</i> (4/4)
Q322T	14/82	<i>Alaskan</i> (2/2), <i>NC</i> (12/13)
E328Q	48/82	<i>B95-8</i> (48/51)
G331Q	11/82	<i>NC</i> (11/11)
Q334R	15/82	<i>China 1</i> (4/4), <i>Med-</i> (9/10), <i>rec</i> (2/2)
G335D	3/82	<i>NC</i> (3/13)
L338P	14/82	<i>Alaskan</i> (2/2), <i>NC</i> (12/13)
L338S	11/82	<i>China 1</i> (2/4), <i>Med-</i> (8/10), <i>rec</i> (1/2)
D349A	3/82	<i>Med-</i> (2/10), <i>rec</i> (1/2)
H352N	11/82	<i>NC</i> (11/11)
H352R	12/82	<i>B95-8</i> (1/51), <i>Med-</i> (9/10), <i>rec</i> (2/2)
G355C	3/82	<i>B95-8</i> (1/51), <i>China 1</i> (1/4), <i>rec</i> (1/2)
H358P	13/82	<i>Med-</i> (1/10), <i>NC</i> (12/13)
S366T	73/82	<i>Alaskan</i> (2/2), <i>B95-8</i> (46/51), <i>China 1</i> (4/4), <i>Med-</i> (8/10), <i>NC</i> (11/13), <i>rec</i> (2/2)
D372N	4/82	<i>B95-8</i> (4/51)

Таблица 3. Клинико-лабораторные показатели в группах ВИЧ(+) пациентов

Table 3. Clinical and laboratory parameters in HIV(+) patient groups

Показатель Parameter		Группа/Group				
		G1 (n = 30)	G2 (n = 20)	G3 (n = 43)	G4 (n = 45)	Всего/Total (n = 138)
Возраст Age	лет years	41 [37; 46]	34 [29; 37]	40 [38; 46]	37 [32; 42]	38 [33; 44]
	женский, n (%) female, n (%)	12 (40,0)	8 (40,0)	19 (44,2)	26 (57,8)	65 (47,1)
Пол Sex	мужской, n (%) male, n (%)	18 (60,0)	12 (60,0)	24 (55,8)	19 (42,2)	73 (52,9)
	отн., в % rel., in %	4,8 [2,0; 10,4]	34,9 [30,8; 37,9]	9,1 [6,0; 13,2]	33,8 [27,1; 39,9]	19,6 [7,4; 33,7]
CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T-lymphocytes	клеток/мкл cells/ μ l	52 [16; 142]	628 [525; 787]	127 [89; 159]	658 [558; 910]	260 [100; 605]
	РНК ВИЧ HIV RNA	копий/мл copies/ml	270000 [43 250; 660 000]	7300 [2825; 18 250]	1200 [58; 250 000]	58 [58; 83]
ДНК ВЭБ EBV DNA	R±σr, %	86,7±6,2	70,0±10,3	81,4±5,9	48,9±7,4	70,3±3,9
	копий/10 ⁵ клеток copies/10 ⁵ cells	121 [34; 252]	6 [1; 9]	54 [8; 212]	9 [2; 14]	18 [5; 139]
Приверженность АРТ Adherence to ART	Z, n (%)	30 (100)	20 (100)	0	0	50 (36,2)
	L, n (%)	0	0	23 (53,5)	5 (11,1)	28 (20,3)
	M, n (%)	0	0	1 (2,3)	4 (8,9)	5 (3,6)
	H, n (%)	0	0	19 (44,2)	36 (80,0)	55 (39,9)

Таблица 4. Различия показателей количества CD4⁺ Т-лимфоцитов и вирусной нагрузки ВЭБ и ВИЧ при инфицировании ВЭБ с разными молекулярно-генетическими характеристиками LMP-1Table 4. Differences in CD4⁺ T-lymphocyte counts and EBV and HIV viral load during infection with EBV with different LMP-1 molecular genetic characteristics

Субвариант LMP-1 ВЭБ EBV LMP-1 subvariant	Группа Group	Показатель Indicator	Ед. измерения Units	Δ (95% ДИ), (нет-есть) Δ (95% CI), (absent-present)	скорр. p adj. p
S309N	G1	РНК ВИЧ HIV RNA	копии/мл copies/ml	-443 278 (-135 000 — -50 000)	0,049
E328Q	G1	РНК ВИЧ HIV RNA	копии/мл copies/ml	441 777 (50 000-1 350 000)	0,049
Q334R	G1	ДНК ВЭБ EBV DNA	копии/10 ⁵ клеток copies/10 ⁵ cells	-460 (-11 089 — -15)	0,049
E328Q	G3	ДНК ВЭБ EBV DNA	копии/10 ⁵ клеток copies/10 ⁵ cells	107 (1-875)	0,049
H358P	G3	ДНК ВЭБ EBV DNA	копии/10 ⁵ клеток copies/10 ⁵ cells	-872 (-1031 — -16)	0,049

Примечание. В таблице приведены только выявленные статистически значимые различия (скорректированный p < 0,05).

Note. Significant differences are presented (adjusted p < 0.05).

Обсуждение

В России исследования молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ и оценка его взаимосвязи с выраженностью клинико-лабораторных показателей у ЛЖВ не проводились. За рубежом при изучении данного вопроса анализировались только однородные группы пациентов, сформированные на основе одного признака (количество CD4⁺ Т-лимфоцитов либо АРТ) [34, 35, 36, 40]. При этом основная часть исследований была посвящена оценке типов вируса — ВЭБ-1 и ВЭБ-2. В нашей работе анализ данных выполнен комплексно с учетом количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, вирусной нагрузки ВИЧ, применения и приверженности АРТ у пациентов, с одной стороны, и молекулярно-генетических особенностей ВЭБ (типа ВЭБ, варианта и субварианта LMP-1 данного вируса), с другой стороны.

Нами показано, что определяемый уровень вирусной нагрузки ВИЧ возрастает у пациентов с низким содержанием CD4⁺ Т-лимфоцитов, высокой вирусной нагрузкой ВЭБ, низкой приверженностью АРТ или в ее отсутствие. Анализ коэффициентов линейной модели показал, что вирусная нагрузка ВЭБ вносит хоть и меньший по отношению к содержанию CD4⁺ Т-лимфоцитов и приверженности АРТ, но статистически значимый вклад в изменение вирусной нагрузки ВИЧ. Положительная корреляция между вирусной нагрузкой ВЭБ и ВИЧ и обратная корреляция их уровней с количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов ранее была установлена в ряде зарубежных исследований [24, 28, 37]. Отметим, что количественная характеристика ВЭБ у ВИЧ-инфицированных в контексте приверженности АРТ до сих пор не проводилась.

В основе типирования ВЭБ-1 и ВЭБ-2 лежат различия последовательностей генов *EBNA-2*, *EBNA-3A*, *EBNA-3B* и *EBNA-3C*. Данная классификация ВЭБ используется уже в течение 40 лет. Современные работы подтверждают четкое разделение вирусной популяции на два основных типа [8, 49]. Известно, что доминирующим типом во всем мире является ВЭБ-1. Его наибольшая распространенность отмечается в Европе, Азии, Северной и Южной Америке [49]. Представлены первые сведения о том, что преимущественно ВЭБ-1 обнаруживается и в России [6, 11]. ВЭБ-2 также встречается повсеместно, но наиболее высокая частота выявления данного типа ограничивается странами Африки к югу от Сахары и отдельными группами населения, включая лиц с ВИЧ/СПИД [18, 38, 48]. Отмечается, что ВЭБ-2 редко выявляется в общей европеоидной популяции, но стал эндемичным в сообществе гомосексуальных мужчин [48]. По данным зарубежных

публикаций в популяции ЛЖВ преобладает ВЭБ-1, за ним следует ВЭБ-2 и коинфекция обоими типами вируса [18, 24, 35, 43]. Полученные нами результаты типовой структуры нижегородских изолятов ВЭБ у ВИЧ(+) пациентов согласуются с этими представлениями.

Анализ взаимосвязи изучаемых клинико-лабораторных показателей с выявленными типами ВЭБ у ВИЧ(+) пациентов на основе метода главных компонент показал, что вирусная нагрузка ВЭБ и ВИЧ при ВЭБ-1+ВЭБ-2 коинфицировании выше, а у пациентов, инфицированных только ВЭБ-2, ниже по сравнению с теми, у кого выявлен ВЭБ-1. Данные других исследователей на этот счет неоднозначны. В ряде работ приводятся аналогичные результаты [35, 38]. При этом в иммунологическом профиле пациентов инфицирование ВЭБ-2 значительно чаще сопряжено с количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов ≥ 500 клеток/мкл [40] и низкими уровнями цитокинов, особенно IFN γ и IL-4 [35]. В других публикациях, наоборот, при инфицировании ВЭБ-2 регистрировалась более высокая вирусная нагрузка, чем при ВЭБ-1 и ВЭБ-1+ВЭБ-2 [43]. Вопрос, посвященный изучению биологических функций основных типов ВЭБ у ЛЖВ, требует продолжения исследований. В том числе в контексте последних данных о том, что ВЭБ-2, в отличие от ВЭБ-1, *in vitro* и *in vivo* инфицирует не только В-клетки, но и Т-клетки [16, 17].

Молекулярно-генетическая характеристика других генов ВЭБ также лежит в основе ряда классификаций вируса [8]. Однако у ВИЧ-инфицированных лиц они применялись редко. Так исследователи ограничились поиском отдельных SAO-подобных мутаций в гене *LMP-1* (делеция 30 н.о./10 а.к. (а.к. 346–355) и больший размер области тандемных повторов) в контексте изучения ВИЧ-ассоциированных лимфом [18, 24, 25, 29, 48]. Отметим, что использование наиболее популярной классификации по R. Edwards и соавт. [20] у ВИЧ-инфицированных было представлено только в одной публикации в 2023 г. [43].

Полученный нами спектр штаммов LMP-1 ВЭБ у ВИЧ-инфицированных включал варианты *B95-8*, *China 1*, *Med-*, *NC* и *Alaskan*, а также варианты *rec* вне классификации R. Edwards и соавт. [20]. Ранее последовательности LMP-1, изолированные в других регионах России, в основном у здоровых людей и онкологических больных, были отнесены к вариантам *B95-8*, *China 1*, *Med+*, *Med-* и *NC* [4, 10]. Российскими учеными были обнаружены также варианты LMP-1 «вне классификации», в том числе уникальный среди изолятов этнических татар Поволжья «LMP1-TatK» [11]. Собственные результаты дополняют уже имеющиеся сведения

о доминировании на территории Европейской части России варианта *B95-8* (62,2% нижегородских изолятов) [6, 10]. Напротив, в работе ученых из Китая штаммы *LMP-1 B95-8* не были обнаружены совсем, а преобладал вариант *China 1* (73,8%) и сопряженные с ним *CAO*-подобные мутации [43]. В настоящее время накоплено достаточно данных, свидетельствующих о взаимосвязи циркулирующих штаммов ВЭБ с определенным географическим положением или этнической принадлежностью. Однако ключевым вопросом остается оценка клинической значимости генетического разнообразия ВЭБ.

Анализ взаимосвязи изучаемых нами клинико-лабораторных показателей с выявленными вариантами *LMP-1* ВЭБ на основе метода главных компонент показал, что при инфицировании пациентов вариантом *LMP-1 B95-8* вирусная нагрузка ВЭБ и ВИЧ была меньше по сравнению с другими вариантами *LMP-1*. В предыдущих исследованиях нами продемонстрировано, что у детей, инфицированных вирусом с молекулярно-генетическим профилем *ВЭБ-1/B95-8*, *ВЭБ-ИМ* протекал легче и с меньшей выраженностью синдрома интоксикации [7].

Мировой опыт свидетельствует о том, что многочисленные попытки найти варианты ВЭБ высокого онкогенного риска или специфические для *ИМ* и других ВЭБ-ассоциированных заболеваний при использовании классификации R. Edwards и соавт. [20] были мало доказательными [4, 13, 41]. В то же время выход за рамки этой классификации в направлении поиска новых генетических маркеров ВЭБ (не только анализ транслированных аминокислотных замен в *LMP-1*, но и дополнительные характеристики этого и других генов) позволил достичь определенных успехов. Относительно недавно было показано, что высокий (32-кратный) риск развития рака носоглотки на эндемичной территории юга Китая ассоциирован с аминокислотными заменами в трех вирусных белках (*BALF2 V317M*, *BNRF1 G696R*, *BNRF1 V1222I*, *RPMS1 D51E*) [47]. Сербские ученые обнаружили, что повышение печеночных трансаминаз (*АЛТ* и *АСТ*) у больных *ИМ*, ассоциировалось с вариантами *LMP-1* ВЭБ, в составе которых были обнаружены 3 или 4 tandemных повтора [13]. В наших ранних исследованиях было показано, что аминокислотные замены *L338S* и *S229T* в белке *LMP-1* связаны с более тяжелым течением *ВЭБ-ИМ* у детей [7].

В данной работе нами также применен комплексный подход, основанный на оценке широкого спектра выявленных мутаций (делеции, количество и состав tandemных повторов, аминокислотные замены), обозначенных нами как субварианты вируса. В результате установлены

субварианты *LMP-1* ВЭБ на уровне аминокислотных замен (*S309N*, *E328Q*, *Q334R*, *N358P*), которые ассоциированы с изменением количества РНК ВИЧ и ДНК ВЭБ по сравнению с пациентами, инфицированными другими вариантами и субвариантами вируса. При этом полученные результаты указывают на то, что биологический потенциал этих мутаций реализуется в условиях иммунодефицита (ВИЧ+) пациенты в группах *G1* и *G3*), когда вследствие истощения пула $CD4^+$ Т-лимфоцитов ≤ 200 клеток/мкл ВИЧ-инфекция приводит к потере иммунологического контроля над ВЭБ-инфекцией [34, 40, 45].

Известно, что *LMP-1* представляет собой онкогенный сигнальный белок, экспрессирующийся как в латентном, так и литическом циклах [14, 33]. С-терминальный цитоплазматический домен ответственен за индукцию множества внутриклеточных сигнальных путей, включая *NF-κB*, митоген-активируемые белковые киназы *JNK* и *p38*, малую *ГТФазу cdc42* и *JAK/AP1/STAT* каскады. Кроме того, в В-и эпителиальных клетках белок *LMP-1* работает как гомолог семейства рецептора фактора некроза опухоли (*TNFR*) [44]. Следовательно, мутантный белок *LMP-1* может оказывать влияние на нормальные клеточные процессы, изменяя результаты канонических сигнальных путей, непосредственно вмешиваясь в их реализацию. К настоящему времени лишь небольшая часть из описанных в литературе аминокислотных замен в белке *LMP-1* была функционально охарактеризована.

Среди выявленных нами значимых субвариантов *LMP-1* аминокислотная замена *E328Q* встречалась исключительно в изолятах *B95-8* (с частотой до 100%). Выявление этого субварианта у ВИЧ(+) лиц было связано с меньшей репликативной активностью ВИЧ (в группе *G1*) и ВЭБ (в группах *G1* и *G3*). Накоплены данные, что мутация *E328Q* преобладает в российских изолятах *LMP-1 B95-8* как у больных, так и здоровых лиц [4, 6, 10]. В других географических регионах она встречается редко [12, 13]. Следует отметить, что в литературе описаны и другие аминокислотные замены в позиции 328 белка *LMP-1*. Например, мутация *E328A*, которая характеризует известный штамм *LMP-1 CAO*, первоначально выделенный из образцов карциномы носоглотки у пациента из Китая [10, 25], или замена *E328D*, обнаруженная в 41% образцов карциномы слюнных желез и носоглотки в странах Юго-Восточной Азии [26]. При исследовании российских изолятов ВЭБ с набором часто встречающихся мутаций (*I85L*, *F106Y*, *E328Q*, *S366T*) было показано, что их функциональное значение проявляется в снижении цитотоксичности и усилении трансформирующей активности белка *LMP-1* [4, 39]. Однако

данные, экспериментально подтверждающие биологическую роль именно аминокислотной замены E328Q, пока отсутствуют.

Другой значимый субвариант *S309N* связан с группой всех остальных, так называемых высокодивергентных вариантов LMP-1 ВЭБ (не *B95-8*). В нашем исследовании он был ассоциирован с более высокими значениями концентрации РНК ВИЧ в плазме крови пациентов группы G1. Несмотря на то что данная аминокислотная замена входит в перечень известных САО-подобных мутаций, о ее функциональном значении известно мало. Только в ранних публикациях приводятся свидетельства того, что замена серина в положениях 309, 311, 313, как основных сайтов фосфорилирования в интактном LMP-1, может приводить к изменению биологической функции этого белка [30].

Субвариант *Q334R* (специфическая мутация для вариантов LMP-1 *China 1* и *Med-*) характеризовал значительно более высокие уровни вирусной нагрузки ВЭБ у ВИЧ(+) пациентов в группе G1. Замена *Q334R* также известна как САО-мутация. Установлено, что в белке LMP-1 она находится в сайте распознавания Т-лимфоцитов молекулой HLA I класса A24. Так в последовательностях LMP-1 ВЭБ, установленных из образцов опухолей носоглотки, были охарактеризованы мутации в эпитопах связывания цитотоксических Т-лимфоцитов, в частности KGGRDGPPS (штаммы *China 1* и *Med-*) в координатах а.к. 330–338, которые по сравнению с KGGDQGPPL (штамм *B95-8*) препятствуют презентации LMP-1 в составе HLA I класса, что приводит к снижению эффективности распознавания таких белков клетками иммунной системы [21].

Уровни вирусной нагрузки ВЭБ в группе G3 были также выше, если выявлялся субвариант *H358P*. Хотя это достаточно распространенная типичная аминокислотная замена в штаммах *NC*, ее функциональная роль остается неизученной [6, 10]. Мутация находится в координатах одного из С-концевых активирующих доменов LMP-1 — STAR2 (а.к. 351–386), который является основным активатором NF-κB посред-

ством TRAF2 и TRAF6 (канонический путь), участвуя в регуляции множества клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток [15]. Кроме того, предполагается, что указанная замена может приводить к нарушению способности LMP-1 связывать NOS белки, что приводит к повышению его концентрации в клетке [10].

Для выяснения функциональной роли выявленных мутаций LMP-1 необходимо продолжение экспериментальных работ *in vitro* и *in vivo*.

Заключение

Впервые в России выявлены особенности клиничко-лабораторных показателей ВЭБ+ВИЧ-коинфекции при инфицировании разными субвариантами LMP-1 (на уровне аминокислотных замен). Коинфекция ВЭБ-1/LMP-1 (*S309N*)+ВИЧ у «наивных» пациентов с тяжелым иммунодефицитом протекала с более высокой, а ВЭБ-1/LMP-1(*E328Q*)+ВИЧ — с наименьшей вирусной нагрузкой ВИЧ. При этом наиболее высокие значения концентрации ДНК ВЭБ у этих пациентов наблюдались при коинфекции ВЭБ-1/LMP-1(*Q334R*)+ВИЧ. Субварианты ВЭБ-1/LMP-1(*E328Q*) и ВЭБ-1/LMP-1(*H358P*) в группе «опытных» пациентов с тяжелым иммунодефицитом на фоне проводимой АРТ (в течение 3-х лет и более) и, следовательно, низкой или неопределяемой вирусной нагрузкой ВИЧ были ассоциированы с вирусной нагрузкой ВЭБ. При этом уровень ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови был значительно ниже при инфицировании вирусом с молекулярно-генетическим профилем ВЭБ-1/LMP-1(*E328Q*) и, наоборот, выше, в случае профиля ВЭБ-1/LMP-1(*H358P*).

На наш взгляд, важным аспектом является дальнейшее изучение функциональных свойств именно этих мутаций. В контексте решаемых в данном исследовании задач необходимо проведение более масштабных и системных исследований на разных территориях РФ с участием профильных специалистов научного и врачебного сообществ.

Список литературы/References

1. Видулов Г.Х., Орадовская И.В., Колобухина Л.В., Русанова С.А., Антипят Н.А., Тюрин И.Н. Герпесвирусные инфекции и ВИЧ (диагностика и клинические особенности) // *Врач*. 2023. Т. 34, № 12. С. 91–97. [Vikulov G., Oradovskaya I., Kolobukhina L., Rusanova S., Antipyat N., Tyurin I. Herpesvirus infections and HIV (diagnosis and clinical features). *Vrach = The Doctor*, 2023, vol. 34, no. 12, pp. 91–97. (In Russ.)] doi: 10.29296/25877305-2023-12-19
2. Давидович Г.М., Карпов И.А. Клиническое течение вирусной инфекции Эпштейн–Барр у пациентов с ВИЧ // *Рецепт*. 2007. № 4 (54). С. 115–117. [Davidovich G.M., Karpov I.A. Clinical course of Epstein–Barr viral infection in patients with HIV. *Retsept = Recipe*, 2007, no. 4, pp. 115–117. (In Russ.)]
3. Мартынова Г.П., Кузнецова Н.Ф., Мазанкова Л.Н., Шарипова Е.В. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным инфекционным мононуклеозом. СПб., 2013. 70 с. [Martynova G.P., Kuznetsova N.F., Mazankova L.N., Sharipova E.V. Clinical recommendations (treatment protocol) for providing medical care to children with infectious mononucleosis. *St. Petersburg*, 2013. 70 p. (In Russ.)] URL: <http://niidi.ru/dotAsset/a6816d03-b0d9-4d37-9b09-540f48e3ed43.pdf6> (13.12.2022)

4. Павлиш О.А., Дидук С.В., Смирнова К.В., Шербак Л.Н., Гончарова Е.В., Шалгинских Н.А., Архипов В.В., Кичигина М.И., Степина В.Н., Белоусова Н.В., Османов Е.А., Яковлева Л.С., Гурцевич В.Э. Мутации гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у российских больных с лимфоидной патологией и здоровых лиц // Вопросы вирусологии. 2008. Т. 53, № 1. С. 10–16. [Pavlish O.A., Diduk S.V., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Goncharova E.V., Shalginskikh N.A., Arkhipov V.V., Kichigina M.I., Stepina V.N., Belousova N.V., Osmanov E.A., Iakovleva L.S., Gurtsevich V.E. Mutations of the Epstein–Barr virus LMP1 gene mutations In Russian patients with lymphoid pathology and healthy individuals. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 10–16. (In Russ.)]
5. Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1057–1066. [Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Kulova E.A. Methodological basics for differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1057–1066. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MBF-1661
6. Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Соболева Е.А., Кулова Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика нижегородских изолятов вируса Эпштейна–Барр у детей при инфекционном мононуклеозе и здоровом вирусоносительстве // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 275–288. [Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Soboleva E.A., Kulova E.A. Molecular and genetic characteristics of Nizhny Novgorod Region Epstein–Barr virus isolates in children with infectious mononucleosis and healthy virus carriers. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 275–288. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MAG-2056
7. Попкова М.И., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Соболева Е.А., Назарова Л.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса Эпштейна–Барр: взаимосвязь с клиническими особенностями инфекционного мононуклеоза у детей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 481–496. [Popkova M.I., Utkin O.V., Filatova E.N., Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Soboleva E.A., Nazarova L.V. Molecular genetic characterization of the Epstein–Barr Virus: a relationship with the clinical features of pediatric infectious mononucleosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 481–496. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MGC-2121
8. Попкова М.И., Уткин О.В. Генетическое разнообразие вируса Эпштейна–Барр: современный взгляд на проблему // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 1. С. 93–108. [Popkova M.I., Utkin O.V. Genetic diversity of the Epstein–Barr virus: a modern view of the problem. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 1, pp. 93–108. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-228
9. Рассохин В.В., Некрасова А.В., Байков В.В., Ильин Н.В., Виноградова Ю.Н. Эпидемиология, диагностика и лечение ВИЧ-ассоциированных неходжкинских лимфом // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2018. Т. 10, № 3. С. 17–29. [Rassokhin V.V., Nekrasova A.V., Baikov V.V., Ilyin N.V., Vinogradova Yu.N. Epidemiology, diagnosis, and treatment of HIV-associated non-hodgkin lymphomas. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 17–29. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2018-10-3-17-29
10. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 5. С. 239–247. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the russian Far East. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2017, vol. 22, no. 5, pp. 239–247. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247
11. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65, № 2. С. 77–86. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86
12. Arturo-Terranova D., Giraldo-Ocampo S., Castillo A. Molecular characterization of Epstein–Barr virus variants detected in the oral cavity of adolescents in Cali, Colombia. *Biomedica*, 2020, vol. 40, suppl. 1, pp. 76–88. doi: 10.7705/biomedica.4917
13. Banko A., Lazarevic I., Stevanovic G., Cirkovic A., Karalic D., Cupic M., Banko B., Milovanovic J., Jovanovic T. Analysis of the Variability of Epstein–Barr Virus Genes in Infectious Mononucleosis: Investigation of the Potential Correlation with Biochemical Parameters of Hepatic Involvement. *J. Med. Biochem.*, 2016, vol. 35, no. 3, pp. 337–346. doi: 10.1515/jomb-2015-0021
14. Caves E.A., Butch R.M., Cook S.A., Wasil L.R., Chen C., Di Y.P., Lee N., Shair K.H.Y. Latent Membrane Protein 1 Is a Novel Determinant of Epstein–Barr Virus Genome Persistence and Reactivation. *mSphere*, 2017, vol. 2, no. 6: e00453-17. doi: 10.1128/mSphereDirect.00453-17
15. Cheerathodi M.R., Meckes D.G. Jr. The Epstein–Barr virus LMP1 interactome: biological implications and therapeutic targets. *Future Virol.*, 2018, vol. 13, no. 12, pp. 863–887. doi: 10.2217/fvl-2018-0120
16. Coleman C.B., Daud I.I., Ogolla S.O., Ritchie J.A., Smith N.A., Sumba P.O., Dent A.E., Rochford R. Epstein–Barr Virus Type 2 Infects T Cells in Healthy Kenyan Children. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216, no. 6, pp. 670–677. doi: 10.1093/infdis/jix363
17. Coleman C.B., Lang J., Sweet L.A., Smith N.A., Freed B.M., Pan Z., Haverkos B., Pelanda R., Rochford R. Epstein–Barr Virus Type 2 Infects T Cells and Induces B Cell Lymphomagenesis in Humanized Mice. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 21: e00813-18. doi: 10.1128/JVI.00813-18
18. Correa R.M., Fellner M.D., Durand K., Redini L., Alonio V., Yampolsky C., Colobraro A., Sevlever G., Teysseie A., Benetucci J., Picconi M.A. Barr virus genotypes and LMP-1 variants in HIV-infected patients. *J. Med. Virol.*, 2007, vol. 79, no. 4, pp. 401–407. doi: 10.1002/jmv.20782
19. Dandachi D., Morón F. Effects of HIV on the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, vol. 1263, pp. 45–54. doi: 10.1007/978-3-030-44518-8_4
20. Edwards R.H., Seillier-Moisevitch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology*, 1999, vol. 261, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855

21. Edwards R.H., Sitki-Green D., Moore D.T., Raab-Traub N. Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 2, pp. 868–881. doi: 10.1128/jvi.78.2.868-881.2004
22. Gärtner B.C., Kortmann K., Schäfer M., Mueller-Lantzsch N., Sester U., Kaul H., Pees H. No correlation in Epstein–Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 6: 2458. doi: 10.1128/JCM.38.6.2458-2458.2000
23. Gianella S., Massanella M., Wertheim J.O., Smith D.M. The Sordid Affair Between Human Herpesvirus and HIV. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 6, pp. 845–852. doi: 10.1093/infdis/jiv148
24. Giron L.B., Ramos da Silva S., Barbosa A.N., Monteiro de Barros Almeida R.A., Rosário de Souza Ld., Elgui de Oliveira D. Impact of Epstein–Barr virus load, virus genotype, and frequency of the 30 bp deletion in the viral BNLf-1 gene in patients harboring the human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.*, 2013, vol. 85, no. 12, pp. 2110–2118. doi: 10.1002/jmv.23722
25. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I., Klein G., Winberg G. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLf-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, no. 1, pp. 2399–2409. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2399
26. Jen K.Y., Higuchi M., Cheng J., Li J., Wu L.Y., Li Y.F., Lin H.L., Chen Z., Gurtsevitch V., Fujii M., Saku T. Nucleotide sequences and functions of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 genes isolated from salivary gland lymphoepithelial carcinomas. *Virus Genes*, 2005, vol. 3, no. 2, pp. 223–235. doi: 10.1007/s11262-004-5630-5
27. Lang F., Pei Y., Lamplugh Z.L., Robertson E.S. Molecular Biology of EBV in Relationship to HIV/AIDS-Associated Oncogenesis. *Cancer Treat. Res.*, 2019, vol. 177, pp. 81–103. doi: 10.1007/978-3-030-03502-0_4
28. Lupo J., Germe R., Lancar R., Algarte-Genin M., Hendel-Chavez H., Taoufik Y., Mounier N., Partisani M., Bonnet F., Meyohas M.C., Marchou B., Philippova A., Prevot S., Costagliola D., Morand P., Besson C. Prospective evaluation of blood Epstein–Barr virus DNA load and antibody profile in HIV-related non-Hodgkin lymphomas. *AIDS*, 2021, vol. 35, no. 6, pp. 861–868. doi: 10.1097/QAD.0000000000002839
29. Martini M., Capello D., Serraino D., Navarra A., Pierconti F., Cenci T., Gaidano G., Larocca L.M. Characterization of variants in the promoter of EBV gene BZLF1 in normal donors, HIV-positive patients and in AIDS-related lymphomas. *J. Infect.*, 2007, vol. 54, no. 3, pp. 298–306. doi: 10.1016/j.jinf.2006.04.015
30. Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein–Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, no. 5, pp. 2637–2645. doi: 10.1128/JVI.67.5.2637-2645.1993
31. Mujtaba S., Varma S., Sehgal S. Coinfection with Epstein–Barr virus in north Indian patients with HIV/AIDS. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 2005, vol. 48, no. 3, pp. 349–353.
32. Musukuma-Chifulo K., Siddiqi O.K., Chilyabanyama O.N., Bates M., Chisenga C.C., Simuyandi M., Sinkala E., Dang X., Koralknik I.J., Chilengi R., Munsaka S. Epstein–Barr Virus Detection in the Central Nervous System of HIV-Infected Patients. *Pathogens*, 2022, vol. 11, no. 10: 1080. doi: 10.3390/pathogens11101080
33. Nawandar D.M., Ohashi M., Djavadian R., Barlow E., Makielski K., Ali A., Lee D., Lambert P.F., Johannsen E., Kenney S.C. Differentiation-Dependent LMP1 Expression Is Required for Efficient Lytic Epstein–Barr Virus Reactivation in Epithelial Cells. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 8: e02438-16. doi: 10.1128/JVI.02438-16
34. Pereira L.M.S., Dos Santos França E., Costa I.B., Lima I.T., Freire A.B.C., de Paula Ramos F.L., Monteiro T.A.F., Macedo O., Sousa R.C.M., Freitas F.B., Costa I.B., Vallinoto A.C.R. Epidemiological risk factors associated with primary infection by Epstein–Barr virus in HIV-1-positive subjects in the Brazilian Amazon region. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 18476. doi: 10.1038/s41598-021-97707-4
35. Pereira L.M.S., França E.D.S., Costa I.B., Lima I.T., Freire A.B.C., Ramos F.L.P., Monteiro T.A.F., Macedo O., Sousa R.C.M., Freitas F.B., Brasil Costa I., Vallinoto A.C.R. Epstein–Barr Virus (EBV) Genotypes Associated with the Immunopathological Profile of People Living with HIV-1: Immunological Aspects of Primary EBV Infection. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 2: 168. doi: 10.3390/v1402016
36. Petrara M.R., Penazzato M., Massavon W., Nabachwa S., Nannyonga M., Mazza A., Gianesin K., Del Bianco P., Lundin R., Sumpter C., Zanchetta M., Giaquinto C., De Rossi A. Epstein–Barr virus load in children infected with human immunodeficiency virus type 1 in Uganda. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 210, no. 3, pp. 392–399. doi: 10.1093/infdis/jiu099
37. Sachithanandham J., Kannangai R., Pulimood S.A., Desai A., Abraham A.M., Abraham O.C., Ravi V., Samuel P., Sridharan G. Significance of Epstein–Barr virus (HHV-4) and CMV (HHV-5) infection among subtype-C human immunodeficiency virus-infected individuals. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 261–269. doi: 10.4103/0255-0857.136558
38. Salahuddin S., Azhar J., Akhtar H., Khan J., Muhammad N. Epstein–Barr virus epidemiology in HIV infected transsexuals. *J. Pak. Med. Assoc.*, 2021, vol. 71, no. 8, pp. 1984–1988. doi: 10.47391/JPMA.02-339
39. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E. The functional analysis of Epstein–Barr virus latent membrane proteins (LMP1) in patients with lymphoproliferative disorders. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, 2010, vol. 4, pp. 386–394. doi: 10.1134/S1990750810040116
40. Traore L., Nikiema O., Ouattara A.K., Compaore T.R., Soubeiga S.T., Diarra B., Obiri-Yeboah D., Sorgho P.A., Djigma F.W., Bisseye C., Yonli A.T., Simpore J. EBV and HHV-6 Circulating Subtypes in People Living with HIV in Burkina Faso, Impact on CD4 T cell count and HIV Viral Load. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, 2017, vol. 9, no. 1: e2017049. doi: 10.4084/MJHID.2017.049
41. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156
42. Vangipuram R., Tying S.K. AIDS-Associated Malignancies. *Cancer Treat. Res.*, 2019, vol. 177, pp. 1–21. doi: 10.1007/978-3-030-03502-0_1
43. Wan Z., Chen Y., Hui J., Guo Y., Peng X., Wang M., Hu C., Xie Y., Su J., Huang Y., Xu X., Xu Y., Zhu B. Epstein–Barr virus variation in people living with human immunodeficiency virus in southeastern China. *Virol. J.*, 2023, vol. 20, no. 1: 107. doi: 10.1186/s12985-023-02078-z

44. Wang L., Ning S. New Look of EBV LMP1 Signaling Landscape. *Cancers (Basel.)*, 2021, vol. 13, no. 21: 5451. doi: 10.3390/cancers13215451
45. Whitehurst C.B., Rizk M., Teklezghi A., Spagnuolo R.A., Pagano J.S., Wahl A. HIV co-infection augments EBV-induced tumorigenesis in vivo. *Front. Virol.*, 2022, vol. 2: 861628. doi: 10.3389/fviro.2022.861628
46. WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. *Geneva: World Health Organization*, 2007. 48 p.
47. Xue W.Q., Wang T.M., Huang J.W., Zhang J.B., He Y.Q., Wu Z.Y., Liao Y., Yuan L.L., Mu J., Jia W.H. A comprehensive analysis of genetic diversity of EBV reveals potential high-risk subtypes associated with nasopharyngeal carcinoma in China. *Virus Evol.*, 2021, vol. 7, no. 1: veab010. doi: 10.1093/ve/veab010
48. Yao Q.Y., Croom-Carter D.S., Tierney R.J., Habeshaw G., Wilde J.T., Hill F.G., Conlon C., Rickinson A.B. Epidemiology of infection with Epstein–Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, no. 5, pp. 4352–4363. doi: 10.1128/JVI.72.5.4352-4363.1998
49. Zealiyas K., Teshome S., Haile A.F., Weigel C., Alemu A., Amogne W., Yimer G., Abebe T., Ierhe N., Ahmed E.H., Baiocchi R.A. Genotype characterization of Epstein–Barr virus among adults living with human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Front. Microbiol.*, 2023, vol. 14: 1270824. doi: 10.3389/fmicb.2023.1270824

Авторы:

Попкова М.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Минаева С.В., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия;

Сахарнов Н.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Popkova M.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Minaeva S.V., PhD (Medicine), Associate Professor of the Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine Department, Privolzhskiy Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Sakharnov N.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

ВЗАИМОСВЯЗЬ *E. COLI*, *ENTEROBACTER* spp. И *S. AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ, С БЕЛКАМИ КРОВИ, СВЯЗАННЫМИ С ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ И ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, ВО ВРЕМЯ 3-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ

Д.В. Комиссарова, И.М. Ларина, Л.Х. Пастушкова, Д.Н. Каширина, Н.А. Усанова, В.К. Ильин

ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. «Сухая» иммерсия является одним из методов имитации ряда факторов космического полета. В проводимых ранее исследованиях микробиоты кишечника у испытуемых в «сухой» иммерсии было выявлено существенное ухудшение состояния микрофлоры. В то же время показано, что регуляторные и метаболические изменения, происходящие во время «сухой» иммерсии, отражаются и на белковом составе крови. Целью настоящего исследования являлось изучение механизмов положительной корреляции количества *E. coli* и отрицательной корреляции *S. aureus* и *Enterobacter* spp., находящихся в кишечнике, с количеством белков в крови человека, изученных с помощью методов протеомики на основе масс-спектрометрии, в эксперименте с 3-суточной «сухой» женской иммерсией. В эксперименте с «сухой» иммерсией продолжительностью 3 суток приняли участие 6 женщин-добровольцев в возрасте от 25 до 40 лет. Во время эксперимента испытуемые не принимали антибактериальные препараты и иные средства, способные оказать влияние на микрофлору. Однократно за 1–2 суток до начала эксперимента и однократно на 1–3 сутки после окончания «сухой» иммерсии отбирались пробы фекалий, в которых оценивалось количество микроорганизмов. Образцы капиллярной крови были получены методом прокола концевой фаланги безымянного пальца у добровольцев за 2 дня до начала эксперимента, в 1, 2 и 3 сутки во время «сухой» иммерсии и через 2 дня после ее окончания. Биоматериал анализировался хромато-масс-спектрометрическим методом на масс-спектрометре «TimsTOF Pro» (Bruker

Адрес для переписки:

Комиссарова Дарья Валерьевна
123007, Россия, Москва, Хорошевское ш., 76А,
ГНЦ РФ – ИМБП РАН.
Тел.: 8 916 077-10-58. E-mail: d.komisarova@yandex.ru

Contacts:

Daria V. Komissarova
123007, Russian Federation, Moscow, Khoroshevskoye hwy, 76A,
State Scientific Center of the Russian Federation —
Institute of Medical and Biological Problems of the RAS.
Phone: +7 916 077-10-58. E-mail: d.komisarova@yandex.ru

Для цитирования:

Комиссарова Д.В., Ларина И.М., Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., Усанова Н.А., Ильин В.К. Взаимосвязь *E. coli*, *Enterobacter* spp. и *S. aureus*, выделенных из кишечной микрофлоры, с белками крови, связанными с иммунной системой и инфекционными заболеваниями, во время 3-суточной «сухой» иммерсии // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 951–960. doi: 10.15789/2220-7619-RBE-17615

Citation:

Komissarova D.V., Larina I.M., Pastushkova L.H., Kashirina D.N., Usanova N.A., Ilyin V.K. Relationship between *E. coli*, *Enterobacter* spp. and *S. aureus* isolated from intestinal microflora and blood proteins associated with the immune system and infectious diseases during 3-day dry immersion // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 951–960. doi: 10.15789/2220-7619-RBE-17615

Работа выполнена в рамках тем фундаментальных научных исследований FMFR-2024-0032 «Анализ молекулярно-клеточных изменений при моделировании факторов космического полета» (№ НИОКТР 124070300025-0) и FMFR-2024-0035 «Исследование способов коррекции микробного статуса человека и оптимизации физиологического состояния его пищеварительной системы в искусственной среде обитания. Исследование способов и средств сохранения фототрофного звена от микробных поражений. Исследование адаптации и внутрипопуляционной изменчивости микроорганизмов в условиях искусственной среды обитания и при экстремальных воздействиях» (№ НИОКТР 124070300022-9).

The study was carried out within the framework of the topics of fundamental scientific research FMFR-2024-0032 "Analysis of molecular and cellular changes in the simulation of space flight factors" (No. 124070300025-0) and FMFR-2024-0035 "Investigation of ways to correct the microbial status of humans and optimise the physiological state of their digestive system in an artificial habitat. Investigation of ways and means of preserving the phototrophic link from microbial lesions. Study of adaptation and intrapopulation variability of microorganisms in conditions of artificial habitat and under extreme influences" (No. 124070300022-9).

Daltonics, США). Связь между уровнем белков в образцах и численностью микроорганизмов кишечника была описана с помощью регрессионной модели, где в качестве зависимой переменной выступал определенный белок в крови, а качестве независимой — количество микроорганизмов. Для обработки результатов использовалась программа STATISTICA 12.0. При анализе полученных данных было выявлено 30 белков, положительно коррелирующих с количеством *E. coli* и отрицательно — с количеством *S. aureus* и *Enterobacter* spp. При рассмотрении процессов, в которые вовлечены белки в организме человека, они были разделены на несколько групп в зависимости от характера процессов и локуса экспрессии. В данной работе рассмотрены 6 белков, связанных с инфекционными заболеваниями (PSMA2, PSMC3, PSME2, NCKAP1, LTF, ENO1), и 10 белков, связанных с функциями иммунной системы (упомянутые выше PSMA2, PSMC3, PSME2, NCKAP1, LTF, а также белки CCT2, APOB, FGB, CA1, STOM). Таким образом, необходимо продолжение изучения механизмов, лежащих в основе этой взаимосвязи, и влияния на нее условий, моделирующих эффекты космического полета в интересах обеспечения медицинской безопасности космических полетов.

Ключевые слова: кишечная микрофлора, протеомика, кишечная палочка, золотистый стафилококк, энтеробактерии, «сухая» иммерсия.

RELATIONSHIP BETWEEN *E. COLI*, *ENTEROBACTER* spp. AND *S. AUREUS* ISOLATED FROM INTESTINAL MICROFLORA AND BLOOD PROTEINS ASSOCIATED WITH THE IMMUNE SYSTEM AND INFECTIOUS DISEASES DURING 3-DAY DRY IMMERSION

Komissarova D.V., Larina I.M., Pastushkova L.H., Kashirina D.N., Usanova N.A., Ilyin V.K.

State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. “Dry” immersion is one of the methods for simulating some factors of a space flight. Volunteer-derived intestinal microbiota previously studied by “dry” immersion showed profoundly deteriorated state of microflora and blood protein composition. The study was aimed to analyze mechanisms underlying a positive correlation with amount of intestinal *E. coli*, and negative correlation between *S. aureus* and *Enterobacter* spp. with the number of human blood proteins assessed by proteomics methods based on mass spectrometry, in a 3-day experiment “dry” female immersion. 6 female volunteers aged from 25 to 40 years took part in the 3-days “dry” immersion experiment. During the experiment, the subjects did not take any drugs that could affect the microflora. Fecal samples were collected once per 1–2 days before the onset of the experiment and once on days 1–3 after the end of the “dry” immersion, number of microorganisms in the above-mentioned samples was assessed. Capillary blood samples were obtained by puncture of the terminal phalanx of the ring finger 2 days before the onset of the experiment, on day 1, 2 and 3 during dry immersion and 2 days afterwards. The relationship between the level of proteins in the samples and the number of intestinal microorganisms was described using a regression model in which the blood specific protein was a dependent variable, and the number of microorganisms was an independent variable. The STATISTICA 12.0 program was used for data processing. When analyzing the data obtained, 30 proteins were identified, which positively correlated with the amount of *E. coli* and negatively correlated with the amount of *S. aureus* and *Enterobacter* spp. While considering the events in which these proteins are involved in the human body, they were divided into several groups. In the current study, there were examined 6 proteins associated with infectious diseases (PSMA2, PSMC3, PSME2, NCKAP1, LTF, ENO1) and 10 immune-related proteins (the above-mentioned proteins, as well as CCT2, APOB, FGB, CA1, STOM). Thus, it is necessary to continue close examination of the mechanisms underlying this relationship in the interest of ensuring spaceflight medical safety.

Key words: intestinal microflora, *S. aureus*, proteomics, *E. coli*, *Enterobacter*, “dry” immersion

Введение

Кишечная микробиота представлена огромным количеством различных микроорганизмов: бактерий, вирусов, некоторых эукариот. Соотношение различных микроорганизмов в кишечнике у каждого человека индивидуально, существуют виды, которые присутствуют практически у всех людей. В норме всех представителей кишечной микробиоты можно условно разделить на две группы: условно-патогенные (УПМ) и протективные (ПМ). К последним принято относить *Lactobacillus*

spp., *Bifidobacterium* spp., неэнтеровирулентные штаммы *E. coli*, *Enterococcus* spp. Условно-патогенные микроорганизмы в небольших титрах (как правило, до 10^4 КОЕ/мл) не вызывают проблем, но при уменьшении количества протективных микроорганизмов и, соответственно, снижении интенсивности конкуренции, могут активно размножаться, вызывая спектр дисбиотических состояний [12]. Исследования свидетельствуют, что ряд гастроэнтерологических заболеваний (например, воспалительные заболевания кишечника, неалкогольный стеатогепатит и новообразования желудочно-

кишечного тракта) могут быть связаны с нарушением колонизационной резистентности кишечной микрофлоры [14]. Микробиота кишечника связана и с другими процессами. Она играет важную роль в формировании иммунных функций, поскольку принимает активное участие в развитии лимфоидных тканей, вносит непосредственный вклад в обмен многих веществ, в частности, витаминов и липидов [3, 11]. Имеются также данные о взаимосвязи кишечной микробиоты и нервной системы за счет производимых ею нейроактивных метаболитов [4]. Таким образом, изучение взаимосвязи микробиота—организм хозяина может служить пониманию как фундаментальных закономерностей функционирования организма человека, так и иметь практическое значение в терапии и коррекции определенных состояний.

Исследование протеома крови хозяина, в этой связи, имеет двойное значение. С одной стороны, количественный и качественный состав белков внеклеточной жидкости свидетельствует о состоянии разнообразных функций. С другой стороны, посредством влияния микробиоты на клетки эпителия кишечника и его секреторные элементы ее компоненты способны оказывать влияние на протеом хозяина. В отличие от привычной в протеомике структуры молекулярных цепей (белок-белковые взаимодействия) влияние такого рода может осуществляться через клетку: белок (или другой агент от микробиоты)—клетка хозяина—протеом хозяина.

«Сухая» иммерсия является одним из методов имитации факторов (и эффектов, вызываемых ими) космического полета как гипогравитация, опорная разгрузка, перераспределение жидких сред организма [15]. В проводимых ранее исследованиях микробиоты кишечника у испытуемых в «сухой» иммерсии было выявлено существенное ухудшение состояния микрофлоры: увеличивалась доля УПМ, снижалось количество ПМ [6].

Считается, что определенный вклад в генез проблем с ЖКТ вносят застойные явления в спланхническом бассейне, которые приводят к активации желчеотделения с увеличением секрецией желчи с меньшей концентрацией в ней желчных кислот [5], увеличению секреторной активности инсулярного аппарата и пониженной секреции гастрина [1], а также замедлению скорости детоксикационной активности печени [2]. Таким образом, изучение состояния кишечного микробиома важно для поддержания здоровья участников космических полетов, особенно длительных, когда воздействие стрессорных факторов, таких как повышенная психоэмоциональная напряженность, гиподинамия, пребывание в течение длительного вре-

мени в замкнутом пространстве космического корабля или станции, могут дестабилизировать микрофлору ЖКТ.

В то же время показано, что регуляторные и метаболические изменения, происходящие во время экспериментов с «сухой» иммерсией, отражаются на белковом составе крови. Были показаны изменения уровня плазминогена, фибронектина, других факторов свертывания и фибринолиза, повышение содержания продуктов фибринолиза, активация системы комплемента [13]. Протеомные методы позволяют определить белки, реагирующие на сложный комплекс факторов «сухой» иммерсии, и уточнить молекулярные механизмы изменений в различных физиологических системах.

Целью настоящего исследования являлось изучение механизмов положительной корреляции количества *E. coli* и отрицательной корреляции *S. aureus* и *Enterobacter spp.*, находящихся в кишечнике, с количеством белков в крови человека, изученных с помощью методов протеомики на основе масс-спектрометрии, в эксперименте с 3-суточной «сухой» женской иммерсией.

Материалы и методы

В эксперименте с «сухой» иммерсией продолжительностью 3 суток приняли участие 6 женщин-добровольцев в возрасте от 25 до 40 лет. Во время эксперимента испытуемые не принимали антибактериальные препараты и иные средства, способные оказать влияние на микрофлору. В начале испытаний участницы были синхронизированы по фазе менструального цикла (для каждой из них иммерсия началась в фолликулярной фазе), чтобы избежать различия эффектов эстрадиола на микробиом и белки плазмы. Эксперимент был одобрен биоэтической комиссией ГНЦ РФ — ИМБП РАН (протокол № 544 от 16 июня 2020 г.).

Однократно за 1–2 суток до начала эксперимента и однократно на 1–3 сутки после окончания «сухой» иммерсии отбирались пробы фекалий. Из этих образцов готовили ряд десятикратных разведений в стерильном физиологическом растворе от 10^{-1} до 10^{-9} и, затем, 100 мкл инокулята высевали в чашки Петри с агаризованными питательными средами: кровяной агар, агар МакКонки, маннитол-солевой агар, среда Сабуро, среда МРС, среда Бактофок, цитратный агар, агар для энтерококков, бифидоагар (производитель всех сред — Himedia, Индия). Выросшие колонии подсчитывались и идентифицировались.

Образцы капиллярной крови были получены методом прокола концевой фаланги безымянного пальца у добровольцев за 2 дня до на-

чала эксперимента, в 1, 2 и 3 сутки во время «сухой» иммерсии и через 2 дня после ее окончания. В настоящем исследовании использованы данные за 2 дня до начала иммерсии и на 2 день после окончания эксперимента. Пробы были высушены при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем хранились при -20°C .

Пробоподготовка биоматериала сухих пятен к хромато-масс-спектрометрическому анализу заключалась в следующем: белки экстрагировали в буфере, содержащем 25 мМ бикарбоната аммония, 1% дезоксихолата натрия и 5 мМ ТСЕР (трис-(2-карбокsetил) фосфин гидрохлорид) (Thermo Scientific), при температуре 60°C при 1000 rpm (термомиксер, Eppendorf) в течение 1 ч, затем восстанавливали, алкилировали, осаждали и расщепляли трипсином, как описано в статье [25].

Смеси триптических пептидов разделяли с помощью жидкостной хроматографии на основе нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США), затем анализировали на масс-спектрометре «TimsTOF Pro» (Bruker Daltonics, США) с использованием метода параллельного накопления при последовательной фрагментации (PASEF) [29].

Связь между уровнем белков в образцах и численностью микроорганизмов кишечника была адекватно описана с помощью регрессионной модели, в которой в качестве зависимой переменной выступал определенный белок в крови, а качестве независимой — количество микроорганизмов [10]. Для обработки результатов использовалась программа STATISTICA 12.0. Для распределения белков в зависимости от характера процессов, в которые они вовлечены, и локуса экспрессии использована платформа String.db.

Результаты

При анализе полученных данных было выявлено 30 белков, положительно коррелирующих с количеством *E. coli* и отрицательно — с количеством *S. aureus* и *Enterobacter* spp. При рассмотрении процессов, в которые вовлечены данные белки в организме человека, они были разделены на несколько групп в зависимости от характера процессов и локуса экспрессии. В данной работе рассмотрены 6 белков, связанных с инфекционными заболеваниями и 10 белков, связанных с функциями иммунной системы.

Обозначенные выше категории, по которым были распределены белки, используя возможности платформы String.db, были отобраны по определенному принципу. Во-первых, поскольку исследовалась микрофлора испытуемых в эксперименте «сухая» иммерсия, в котором, как известно, функции системы имму-

нитета серьезно модифицируется [37], была выбрана категория «иммунная система». Далее, поскольку *Enterobacter* spp. и *S. aureus* относятся к условно-патогенным микроорганизмам, была выбрана категория «инфекционные заболевания». В зависимости от целей и задач анализа взаимосвязи «бактерия—белок» могут быть выбраны и другие принципы разделения белков на группы. Изучение глубинных механизмов взаимосвязей «бактерия—белок», в котором, очевидно, необходимо рассматривать многие функции конкретного белка и биохимические процессы бактерий в период эксперимента, влекущие за собой изменения в количестве белка в крови хозяина, еще предстоит в будущих исследованиях.

Белки, связанные с иммунными процессами

Обращает на себя внимание тесная взаимосвязь трех белков PSMA2, PSMC3, PSME2, вовлеченных практически во все обозначенные процессы (регуляция иммунного ответа, развитие инфекционных заболеваний).

PSMA2 является субъединицей протеасомы альфа-типа 2, компонентом протеасомного комплекса 20S, участвующего в протеолитической деградации большинства внутриклеточных белков. Этот белок имеет множество функций, например, связываясь в клетке с двумя регуляторными частицами 19S, он образует протеасому 26S и, таким образом, участвует в АТФ-зависимой деградации убиквитинированных белков.

PSMC3 является компонентом 26S протеасомы, мультибелкового комплекса в АТФ-зависимой деградации убиквитинированных белков. Он играет ключевую роль в механизме клеточного протеостаза, удаляя неправильно свернутые или поврежденные белки, которые могут нарушить работу клетки, а также белки, которые больше клетке не нужны. Изменения в структуре PSMC3 могут стать причиной протеотоксического стресса, что, как отмечают, ведет к повышению уровня интерферона I типа [23].

PSME2 является субъединицей активатора 26S протеасомы. Участвует в сборке иммунопротеасомы и необходим для эффективной обработки антигена [31].

Таким образом, все три белка связаны с работой протеасомы 26S, которая играет важную роль в ряде внутриклеточных процессов, в том числе затрагивающих функции иммунитета, например, в распознавании полиубиквитинированных цепочек. Убиквитинирование белков является важным внутриклеточным регуляторным механизмом, влияющим на передачу сигналов иммунного ответа в пути активации NF- κ B и включении провоспалительных реакций [38].

Известно, что некоторые патогенные бактерии кодируют деубиквитинирующие ферменты, воздействуя на убиквитин-зависимые процессы хозяина и нарушая, тем самым, соответствующий убиквитин-зависимый антибактериальный ответ [38]. Такие свойства присущи высокопатогенным бактериям, проникающим и живущим внутри клетки-хозяина, *Salmonella enterica* (возбудитель сальмонеллеза), *Legionella pneumophila* (возбудитель легионеллеза). Однако имеются также сведения о том, что и ряд условно-патогенных бактерий, например *S. aureus*, *Enterobacter* spp., также способны внедряться в клетки кишечника и активно размножаться [26, 30].

Выявленная отрицательная корреляция условно-патогенных бактерий с количеством белков, входящих в протеасомный комплекс, может свидетельствовать о наличии синтеза деубиквитинирующих ферментов у *S. aureus* и *Enterobacter* spp., что проявлялось в уменьшении количества белков PSMA2, PSMC3, PSME2 с ростом количества бактерий. Активное размножение *E. coli*, проявляющей антагонизм по отношению к *S. aureus* и конкурирующей с *Enterobacter* spp., по-видимому, может сыграть важную роль в снижении количества условно-патогенных бактерий и, таким образом, повышении уровня белков PSMA2, PSMC3, PSME2, что, возможно, скажется в усилении иммунного ответа.

Интересно отметить, что данные белки также отрицательно коррелировали с количеством других условно-патогенных микроорганизмов: *Candida* spp., *S. epidermidis*, и положительно — с некоторыми протективными микроорганизмами (*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp.). Таким образом, дальнейшее изучение взаимосвязи белков протеасомного комплекса может раскрыть некоторые механизмы бактериальной инвазии условно-патогенных микроорганизмов в клетки кишечника, а также ее последствия и в дальнейшем быть использован как диагностический критерий дисбактериозов различной этиологии.

Отдельного внимания заслуживает взаимосвязь белков PSMA2, PSMC3 с белком CCT2, который способен экспрессироваться в энтероцитах и связан с иммунной системой. Белок CCT2 способствует сворачиванию белков при гидролизе АТФ и в составе комплекса TRiC участвует в сворачивании актина и тубулина. Показано, что подмембранный спектрин-актиновый цитоскелет, роль которого в регуляции ионных каналов доказана в ряде исследований [17, 22, 36, 37], является мишенью для кишечных бактериальных патогенов (например, патогенных штаммов *E. coli*, а также *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*) за счет

усиления адгезии клеток, играя решающую роль в прогрессировании дисбиотических состояний [33]. В проводимом ранее анализе данных по влиянию количества белков в крови на количество бактерий была выявлена положительная корреляция уровня CCT2 с количеством бифидобактерий, то есть увеличение уровня данного белка в крови влекло за собой рост количества протективных *Bifidobacterium* spp. Вероятно, механизм взаимодействия CCT2 с бактериальными клетками является более сложным, чем представлялось ранее, и имеет место взаимное влияние белка и бактерий друг на друга, поскольку при изучении влияния количества бактерий на белки была также выявлена взаимосвязь концентрации данного белка с количеством кишечной палочки (положительная корреляция) и с количеством УПМ (отрицательная корреляция). Исследование механизмов взаимодействия данного белка с бактериями может представлять научный и практический интерес с целью определения белковых биомаркеров крови, определяющие наличие и выраженность дисбиотических состояний кишечной микрофлоры.

Еще один комплекс тесно взаимосвязанных белков, участвующих в иммунной регуляции, это белки LTF (лактоферрин), АРОВ (аполипропротеин) и FGB (фибриноген).

В проведенных ранее исследованиях было выявлено, что мыши с дефицитом аполипропротеина в плазме, кодируемого геном АРОВ, были восприимчивы к инвазии *S. aureus* [32]. Хотя в имеющихся литературных данных нет информации о связи данного белка с *Enterobacter* spp., возможно, механизм, лежащий в основе адгезии данных бактерий, схож с механизмом адгезии золотистого стафилококка, чем и объясняется отрицательная корреляция количества данных условно-патогенных бактерий с белком АРОВ. Связь с кишечной палочкой, с которой в нашем исследовании была обнаружена положительная корреляция, не отмечалась другими исследователями, однако возможно она более сложная, чем прямое взаимодействие «бактерия–белок», и основана на конкурентном взаимодействии кишечной палочки и золотистого стафилококка.

Механизм взаимодействия FGB с бактериями, по-видимому, не является прямым. Известно, что фибриноген связывает фибронектин [28], который, в свою очередь, имеет положительную корреляцию с *S. aureus* и гораздо более низкую корреляцию с *E. coli* [34].

Белок LTF (лактоферрин) представляет собой железосвязывающий белок, который взаимодействует с поверхностью бактерий и имеет бактерицидное действие. Белок LTF проявляет сильную антибактериальную и антифунгаль-

ную активность в отношении многих бактерий и грибов, например, *S. epidermidis*, *Helicobacter pylori*, *C. albicans* [39, 40]. Лактотрансферрин также впоследствии применялся для коррекции дисбиотических состояний участниц 5-суточной «сухой» иммерсии и при длительном употреблении зарекомендовал себя как средство, нормализующее кишечный и вагинальный биотоп [8]. Возможно, активация экспрессии лактотрансферрина связана с увеличением количества протективной кишечной палочки и неизбежно, учитывая его антимикробные свойства, ведет к снижению количества условно-патогенных форм микроорганизмов.

Таким образом, положительная корреляция с протективной кишечной палочкой и отрицательная — с условно-патогенными золотистым стафилококком и энтеробактером, подтверждает важность белков LTF, APOB и FGB в иммунной регуляции, и дальнейшее изучение механизмов взаимодействия «микроорганизм–белок» может послужить теоретической базой для обоснования использования протеомного анализа внеклеточной жидкости организма хозяина для оценки рисков развития дисбактериозов.

Еще 3 белка, не имеющие связей с другими белками, осуществляющими иммунную регуляцию, и не связанные между собой, это белки CA1 (карбоангидраза 1), STOM (стоматин) и NCKAP1 (Nck-ассоциированный белок 1).

Белок CA1 осуществляет обратимую гидратацию углекислого газа и способен гидратировать цианамид до мочевины. Интересно отметить, что хотя данный белок не экспрессируется в иммунных клетках, имеются исследования, в которых показана роль данного белка, преимущественно обнаруживаемого в эритроцитах и энтероцитах, как отрицательного биомаркера для диагностики *S. mansoni*, то есть шистосомоза [24]. Хотя шистосомоз, очевидно, не относится к бактериальным инфекциям, возможно роль данного белка в патогенезе инвазивных заболеваний гораздо шире, чем было принято считать. Таким образом, требуется дальнейшее более детальное исследование взаимосвязи белка CA1 с условно-патогенными и протективными бактериями кишечной микрофлоры.

Белок STOM является интегральным белком и локализуется на клеточной мембране эритроцитов и других типов клеток, где осуществляет регуляцию ионных каналов. Функции данного белка остаются во многом невыясненными, однако его массовое присутствие в складках и расширениях мембраны указывает на его возможную структурную роль в формировании этих структур или их закоривании к актиновому цитоскелету. Участие в формировании цитоскелета, который, как было указано ранее, является одной из мишеней бактериальных

патогенов, возможно, свидетельствует о важном значении данного белка в возникновении и прогрессировании дисбиотических состояний за счет улучшения адгезии бактериальных клеток на мембране. Тем не менее в нашем исследовании данный белок положительно коррелировал только с кишечной палочкой и отрицательно — с условно-патогенными золотистым стафилококком и энтеробактером. Возможно, механизм адгезии данных бактерий происходит иначе, чем у кишечной палочки и не включает в себя взаимодействие с белком STOM.

Изученные функции белка NCKAP1 в основном касаются его участия в развитии опухолей. Так, было выявлено, что экспрессия NCKAP1 высоко тканеспецифична и обнаружена при раке толстого кишечника, легких и печени [20]. Также данный белок участвует в регуляции актинового цитоскелета. У мышей, с неполноценным геном NCKAP1, наблюдались аномалии развития лимфоцитов, фагоцитоза и миграции нейтрофилов. У людей же наблюдались случаи иммунодефицита при наличии двух рецессивных мутантных аллелей NCKAP1 [19]. Очевидно, что кодируемый данным геном белок играет важнейшую роль в иммунной системе. Механизмы воздействия кишечной палочки и условно-патогенных микроорганизмов на ткани организма, вызывающий усиление экспрессии гена NCKAP1, остаются неясными и требуют дальнейшего исследования.

Белки, связанные с инфекционными заболеваниями

С инфекционными заболеваниями также связаны уже упомянутые выше PSMA2, PSMC3, PSME2, NCKAP1 и LTF. Эта связь, очевидно, обусловлена взаимоотношениями «иммунитет–бактерия». Кроме этих белков с инфекционными заболеваниями связан белок ENO1 (енолаза 1). Известно, что ENO1 является белком, обеспечивающим толерантность клеток к гипоксии, он также катализирует превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват в процессе гликолиза [21]. В проводимых ранее исследованиях было показано, что высокий уровень ENO1 наблюдался у пациентов, инфицированных *H. pylori* (бактерией, обитающей в складках желудка и ассоциирующейся с развитием язвенной болезни желудка) [41]. Сведения о функциях белка ENO1, тем не менее, остаются не до конца выясненными. Так, например, имеются сведения о том, что ENO1 в клетках-мишенях предотвращает интеграцию ВИЧ-1, а сверхэкспрессия белка в клетках-продуцентах вируса, а также в клетках-мишенях заметно подавляла репликацию вируса [27]. Однако в то же время в литературе имеются данные

о том, что высокий уровень экспрессии ENO1 также наблюдался и у больных с некоторыми раковыми опухолями [18]. Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод о том, что повышение ENO1 ассоциировано с патогенными микроорганизмами и онкогенезом, но при этом играет важную роль в ответе организма на вирусную инвазию. Учитывая положительную корреляцию кишечной палочки и отрицательную — условно-патогенных микроорганизмов с данным белком, необходимо дальнейшее исследование функций данного белка и его роли в регуляции численности кишечной микробиоты.

Обсуждение

Связь компонентов микробиоты кишечника и белкового состава крови молодых женщин исследовалась на фоне модельного воздействия на их организм, имитирующего ранний этап адаптации к невесомости. При этом, несмотря на неидентичный механизм развития эффектов в «сухой» иммерсии и космическом полете по низкой околоземной орбите, достигалось определенное приближение к выраженности физиологических эффектов на системном уровне. На ранних этапах «сухой» иммерсии, безусловно, могли наблюдаться застойные явления в сосудистой сети брюшной полости [1]. Рассмотрение полученных данных с включением третьего агента влияния — воздействия модельных условий на организм хозяина и на микробиоту — на наш взгляд показывает, что сам характер связи микробиоты кишечника и белкового состава крови хозяина может модифицироваться этими условиями.

Один из типов стимуляции, который воспринимает живая клетка, и который изменяется модельными условиями эксперимента в «сухой» иммерсии — механическое напряжение. Изменение внешнего воздействия (его вектора, силы) на клетку закономерно приводит к изменению механического напряжения внутри клетки, запуская каскады изменений не только во внутриклеточном «домашнем хозяйстве», но и в межклеточных контактах. В нашем исследовании выявлено взаимодействие компонентов микробиоты с белками, входящими в состав основных типов механосенсоров. Считается, что ими, в теории, являются внеклеточный матрикс и связанные с ним интегрины и фокально-адгезивный комплекс, механочувствительные ионные каналы (в том числе — эпителиальные натриевые каналы ENaCs), подмембранный цитоскелет и комплексы компонентов внутреннего цитоскелета, метаболизм которых активно влияет на клеточный протеостаз. Механозависимая регуляция

процессов жизнедеятельности клетки по праву считается новым механизмом негуморальной регуляции [16].

Еще одно важное обстоятельство повышает значимость представленных данных и обоснованность выводов, сделанных на их основе. В описанном эксперименте у участниц, в «сухой» иммерсии, собирались образцы капиллярной крови. В процессе подготовки высушенных образцов цельной крови в пробы, анализируемые на МС, попадали как белки плазмы крови, так и внутриклеточные белки из разрушенных клеток, присутствующих в кровотоке. То есть пул анализируемых белков состоял в данном случае из белков плазмы и цитозольных белков эритроцитов, лейкоцитов и т. д. Анализ показал, что численно белки сухих пятен на 75% состоят из внутриклеточных белков [7]. Это дало возможность «подсмотреть» особенности внутреннего хозяйства клеток, а именно значение процессов протеостаза, в том числе — иммунных клеток.

Имеются неоспоримые доказательства влияния бактерий на экспрессию белков контактирующих с ними клеток. Так, при воздействии липидов клеточной стенки микобактерий 166 белков макрофагов показали дифференциальную экспрессию. К ним относятся белки, участвующие в иммунном ответе, окислении и восстановлении, транспорте везикул, а также в других клеточных процессах. Реакция клеток макроорганизма отражает врожденные защитные механизмы клетки, а также патоген-индуцированные процессы, которые могут принести пользу бактерии [35].

Исследования последних лет существенно изменили стандартные представления о патогенезе многих заболеваний. На данный момент получены многочисленные доказательства роли кишечной микробиоты в развитии различных заболеваний, таких как атеросклероз, ожирение, заболевания печени, сахарный диабет, артериальная гипертензия и др. При этом известно несколько механизмов, посредством которых кишечная микрофлора участвует в развитии заболеваний: через продукцию метаболитов (эндогенный этанол и др.), активацию системной воспалительной реакции, изменение метаболизма холина и др. [9]. Однако еще многое предстоит выяснить во взаимоотношениях «хозяин–кишечная микрофлора», так как многие подтвержденные корреляции бактерий кишечника с перечисленными заболеваниями пока не могут быть объяснены. Поэтому исследование влияния микрофлоры кишечника на белки человека в неблагоприятных условиях особенно актуально, и кроме фундаментального значения может способствовать выявлению важных диагностических признаков для выявления дисбиотических состояний кишечного биотопа.

Выводы

1. В результате проведенных исследований была выявлена положительная корреляция между количеством *E. coli* и отрицательная — между количеством *S. aureus* и *Enterobacter* spp. в кишечной микрофлоре и рядом белков в образцах сухих пятен капиллярной крови.

2. Выявленные белки можно разделить на несколько групп в зависимости от их функций и локуса экспрессии: рассмотрены 6 белков, связанные с инфекционными заболеваниями, 10 — с иммунной системой.

3. По механизму действия белки можно разделить на структурные и метаболические.

4. Положительная корреляция с протективной кишечной палочкой и отрицательная — с условно-патогенными золотистым стафилококком и энтеробактер, подтверждает важность ряда выявленных белков в регуляции иммунных функций.

5. Необходимо продолжение пристального изучения механизмов, лежащих в основе этой взаимосвязи, и влияния на нее условий, моделирующих эффекты космического полета в интересах обеспечения медицинской безопасности космических полетов.

Список литературы/References

- Афонин Б.В., Седова Е.А. Состояние пищеварительной системы человека при моделировании эффектов невесомости в условиях иммерсии // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2009. Т. 43, № 1. С. 48–52. [Afonin B.V., Sedova E.A. The state of the human digestive system when modeling the effects of weightlessness under immersion conditions. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2009, vol. 43, no. 1, pp. 48–52. (In Russ.)]
- Афонин Б.В., Седова Е.А., Тихонова Г.А., Соловьева А.А., Валуев В.А. Оценка функциональных изменений печени при моделировании гемодинамических эффектов невесомости в антиортостатическом положении // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2014. Т. 48, № 5. С. 17–22. [Afonin B.V., Sedova E.A., Tikhonova G.A., Solovyova A.A., Valuev V.A. Assessment of functional changes in the liver when modeling the hemodynamic effects of weightlessness in an anti-orthostatic position. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2014, vol. 48, no. 4, pp. 17–22. (In Russ.)]
- Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И. Кишечные инфекции, воспаление и аутоиммунитет. Лимфоидный аппарат кишечника во взаимодействии с кишечной микрофлорой // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013. № 2. С. 113–123. [Balmasova I.P., Sepiashvili R.I. Intestinal infections, inflammation and autoimmunity. Intestinal lymphoid apparatus in interaction with intestinal microflora. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 2, pp. 113–123. (In Russ.)]
- Гаус О.В., Беляков Д.Г. Современные взгляды на роль кишечной микробиоты в формировании патологии кишечника. // *Русский медицинский журнал*. 2021. № 5. С. 10–16. [Gaus O.V., Belyakov D.G. Modern views on the role of intestinal microbiota in the formation of intestinal pathology. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2021, no. 4, pp. 10–16. (In Russ.)]
- Ильин В.К., Афонин Б.В., Комиссарова Д.В., Шеф К.А., Агуреев А.Н., Усанова Н.А., Валуев В.А., Дзех С.А. Исследование влияния изменений микрофлоры кишечника и пробиотического приема пробиотиков на функциональное состояние желудка в изоляционном эксперименте SIRIUS-18/19 // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2021. Т. 55, № 1. С. 70–75. [Ilyin V.K., Afonin B.V., Komissarova D.V., Shef K.A., Agureev A.N., Usanova N.A., Valuev V.A., Dzekh S.A. Study of the influence of changes in intestinal microflora and prophylactic administration of probiotics on the functional state of the stomach in the SIRIUS-18/19 isolation experiment. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2021, vol. 55, no. 1, pp. 70–75. (In Russ.)] doi: 10.21687/0233-528X-2021-55-1-70-75
- Ильин В.К., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Соловьева З.О., Скедина М.А., Ковалева А.А. Исследование физиологических и микробиологических особенностей пародонта человека в эксперименте «сухая» иммерсия // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2020. Т. 54, № 5. С. 112–117. [Ilyin V.K., Rykova M.P., Antropova E.N., Solovieva Z.O., Skedina M.A., Kovaleva A.A. Study of physiological and microbiological features of the human periodontium in the experiment «dry» immersion. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2020, vol. 54, no. 4, pp. 112–117. (In Russ.)] doi: 10.21687/0233-528X-2020-54-4-112-117
- Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Бржозовский А.Г., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Эффекты 3-суточного иммерсионного воздействия на протеом крови женщин // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2023. Т. 57, № 2. С. 47–56. [Kashirina D.N., Pastushkova L.Kh., Brzhozovsky A.G., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Larina I.M. Effects of 3-day immersion on the blood proteome of women. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2023, vol. 57, no. 2, pp. 47–56. (In Russ.)] doi: 10.21687/0233-528X-2023-57-2-47-56
- Комиссарова Д.В., Ильин В.К., Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Жигалова К.Н. Пробиотические и пробиотические способы коррекции микрофлоры влагалища у женщин участниц наземных экспериментов, моделирующих отдельные факторы космического полета // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2023. № 2. С. 74–76. [Komissarova D.V., Ilyin V.K., Priputnevich T.V., Muravyeva V.V., Zhigalova K.N. Prebiotic and probiotic methods for correcting vaginal microflora in female participants in ground-based experiments simulating individual factors of space flight. *Bulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Federal Research Center UB RAS*, 2023, no. 2, pp. 74–76. (In Russ.)] doi: 10.24411/2304-9081-2023-12007
- Костюкевич О.И., Былова Н.А., Симбирцев А.С. Роль кишечной микробиоты в развитии заболеваний печени и желчевыводящих путей // *Русский медицинский журнал*. 2016. № 11. С. 713–720. [Kostyukevich O.I., Bylova N.A., Simbirtsev A.S. The role of intestinal microbiota in the development of liver and biliary tract diseases. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2016, no. 11, pp. 713–720. (In Russ.)]

10. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного статистического анализа данных: учеб. пособие. 5-е изд., перераб. и доп. М.: ИНФРА-М, 2017. 484 с. [Kulaichev A.P. Methods and means of complex statistical data analysis: tutorial. 5th ed., revised. Moscow: INFRA-M, 2017. 484 p. (In Russ.)]
11. Морозов А.М., Минакова Ю.Е., Протченко И.Г. Влияние микрофлоры на синтез витаминов (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. 2019. № 6. С. 167–171. [Morozov A.M., Minakova Yu.E., Protchenko I.G. The influence of microflora on the synthesis of vitamins (review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies*, 2019, no. 6, pp. 167–171. (In Russ.)]
12. Оришак Е.А., Нилова Л.Ю., Авалуева Е.Б., Бойцов А.Г. Условно-патогенные микроорганизмы при дисбактериозе кишечника // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. 2010. № 2. С. 24–27. [Orishak E.A., Nilova L.Yu., Avalueva E.B., Boytsov A.G. Opportunistic pathogenic microorganisms in intestinal dysbiosis. *Uchenye zapiski SPbGMU im. I.P. Pavlova = Scientific Notes of Pavlov First St. Petersburg State Medical University*, 2010, no. 2, pp. 24–27. (In Russ.)]
13. Пастушкова Л.Х., Пахарукова Н.А., Новоселова Н.М., Доброхотов И.В., валеева О.А., Кусто М.А., Ларина И.М. Прямое протеомное профилирование мочи и сыворотки крови человека в эксперименте с 5-суточной «сухой» иммерсией. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2012. Т. 46, № 5. С. 31–37. [Pastushkova L.Kh., Pakharukova N.A., Novoselova N.M., Dobrokhotov I.V., Valeeva O.A., Cousteau M.A., Larina I.M. Direct proteomic profiling of human urine and serum in an experiment with a 5-day “dry” immersion. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2012, vol. 46, no. 4, pp. 31–37. (In Russ.)]
14. Ткаченко Е.И. Парадигма дисбиоза в современной гастроэнтерологии. Роль микробиоты в лечении и профилактике заболеваний в XXI веке // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014, № 5 (105). С. 4–8. [Tkachenko E.I. The paradigm of dysbiosis in modern gastroenterology. The role of microbiota in the treatment and prevention of diseases in the 21st century. *Ekspperimental'nai i klinicheskai gastroenterologiya = Experimental & Clinical Gastroenterology*, 2014, no. 5 (105), pp. 4–8. (In Russ.)]
15. Томиловская Е.С., Рукавишников И.В., Амирова Л.Е., Шигуева Т.А., Савеко А.А., Китов В.В., Васильева Г.Ю., Пономарев С.А., Смирнова Т.А., Козловская И.Б., Орлов О.И. 21-суточная «сухая» иммерсия: особенности проведения и основные итоги. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2020. Т. 54, № 5. С. 5–14. [Tomilovskaya E.S., Rukavishnikov I.V., Amirova L.E., Shigueva T.A., Saveko A.A., Kitov V.V., Vasilyeva G.Yu., Ponomarev S.A., Smirnova T. A., Kozlovskaya I.B., Orlov O.I. 21-day “dry” immersion: features and main results. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2020, vol. 54, no. 4, pp. 5–14. (In Russ.)] doi: 10.21687/0233-528X-2020-54-4-5-14
16. Усик М. Клетки под давлением // Biomolecula.ru: сайт (дата публикации: 08.12.2015) [Usik M. Cells under pressure. Biomolecula.ru: web-site (publication date: 08.12.2015) (In Russ.)] URL: <https://biomolecula.ru/articles/kletki-pod-davleniem>
17. Benos D.J., Awayda M.S., Ismailov I.I., Johnson J.P. Structure and function of amiloride-sensitive Na⁺ channels. *J. Membr. Biol.*, 1995, no. 143, pp. 1–18. doi: 10.1007/BF00232519
18. Capello M., Ferri-Borgogno S., Riganti C., Chattaragada M. Samuel, Principe M., Roux C., Zhou W., Petricoin E.F., Cappello P., Novelli F. Targeting the Warburg effect in cancer cells through ENO1 knockdown rescues oxidative phosphorylation and induces growth arrest. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, pp. 5598–5612. doi: 10.18632/oncotarget.6798
19. Castro C.N., Rosenzweig M., Carapito R., Shahrooei M., Konantz M., Khan A., Miao Z., Groß M., Tranchant T., Radosavljevic M., Paul N., Stemmlen T., Pitoiset F., Hirschler A., Nespola B., Molitor A., Rolli V., Pichot A., Faletti L.E., Rinaldi B., Friant S., Mednikov M., Karauzum H., Aman M.J., Carapito C., Lengerke C., Ziaee V., Eyaid W., Ehl S., Alroqi F., Parvaneh N., Bahram S. NCKAP1L defects lead to a novel syndrome combining immunodeficiency, lymphoproliferation, and hyperinflammation. *J. Exp. Med.*, 2020, vol. 217, no. 12: e20192275. doi: 10.1084/jem.20192275 PMID: 32766723; PMCID: PMC7526481
20. Chen J., Ge J., Zhang W., Xie X., Zhong X., Tang S. NCKAP1 is a Prognostic Biomarker for Inhibition of Cell Growth in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front. Genet.*, 2022, vol. 13. doi: 10.3389/fgene.2022.764957
21. Chung I.-C., Huang W.-Ch., Huang Y.-Ts., Chen M.-L., Tsai A.-W., Wu P.-Y., Yuan T.-T. Unrevealed roles of extracellular enolase1 (ENO1) in promoting glycolysis and procancer activities in multiple myeloma via hypoxia-inducible factor 1 α . *Oncology Reports*, 2023, vol. 50, no. 5. doi: 10.3892/or.2023.8642
22. Devarajan P., Scaramuzzino D.A., Morrow J.S. Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of Na,K-ATPase alpha subunit. *PNAS*, 1995, no. 91, pp. 2965–2969. doi: 10.1073/pnas.91.8.2965
23. Ebstein F., Küry S., Most V., Rosenfelt C., Scott-Boyer M.P., van Woerden G.M., Besnard T., Papendorf J.J., Studencka-Turski M., Wang T., Hsieh T.C., Golnik R., Baldrige D., Forster C., de Konink C., Teurlings S.M.W., Vignard V., van Jaarsveld R.H., Ades L., Cogné B., Mignot C., Deb W., Jongmans M.C.J., Cole F.S., van den Boogaard M.H., Wambach J.A., Wegner D.J., Yang S., Hannig V., Brault J.A., Zadeh N., Bennetts B., Keren B., Gélinau A.C., Powis Z., Towne M., Bachman K., Seeley A., Beck A.E., Morrison J., Westman R., Averill K., Brunet T., Haasters J., Carter M.T., Osmond M., Wheeler P.G., Forzano F., Mohammed S., Trakadis Y., Accogli A., Harrison R., Guo Y., Hakonarson H., Rondeau S., Baujat G., Barcia G., Feichtinger R.G., Mayr J.A., Preisel M., Laumonier F., Kallinich T., Knaus A., Isidor B., Krawitz P., Völker U., Hammer E., Droit A., Eichler E.E., Elgersma Y., Hildebrand P.W., Bolduc F., Krüger E., Bézieau S. PSMC3 proteasome subunit variants are associated with neurodevelopmental delay and type I interferon production. *Sci. Transl. Med.*, 2023, vol. 15, no. 698: eabo3189. doi: 10.1126/scitranslmed.abo3189
24. Kardoush M.I., Ward B.J., Ndao M. Serum Carbonic Anhydrase 1 is a Biomarker for Diagnosis of Human Schistosoma mansoni Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2017, vol. 96, no. 4, pp. 842–849. doi: 10.4269/ajtmh.16-0021
25. Kashirina D., Brzhozovskiy A., Sun W., Pastushkova L., Popova O., Rusanov V., Nikolaev E., Larina I., Kononikhin A. Proteomic characterization of dry blood spots of healthy women during simulation of the microgravity effects using dry immersion. *Front. Physiol.*, 2022, no. 12: 75329. doi: 10.3389/fphys.2021.753291
26. Kim K., Loessner M.J. Enterobacter sakazakii Invasion in Human Intestinal Caco-2 Cells Requires the Host Cell Cytoskeleton and Is Enhanced by Disruption of Tight Junction. *Infect. Immun.*, 2008, vol. 76, no. 2. doi: 10.1128/iai.00937-07
27. Kishimoto N., Yamamoto K., Iga N., Kirihara C., Abe T., Takamune N., Misumi S. Alpha-enolase in viral target cells suppresses the human immunodeficiency virus type 1 integration. *Retrovirology*, 2020, vol. 17: 31. doi: 10.1186/s12977-020-00539-9

28. Makogonenko E., Tsurupa G., Ingham K., Medved L. Interaction of Fibrin(ogen) with Fibronectin: Further Characterization and Localization of the Fibronectin-Binding Site. *Biochemistry*, 2002, vol. 41, no. 25, pp. 7907–7913. doi: 10.1021/bi025770x
29. Meier F., Brunner A.D., Koch S., Koch H., Lubeck M., Krause M., Goedecke N., Decker J., Kosinski T., Park M., Bache N., Hoerning O., Cox J., Räther O., Mann M. Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics*, 2018, vol. 17, no. 12, pp. 2534–2545. doi: 10.1074/mcp.TIR118.000900
30. Mergani A., Wanen D., Schecker N., Branitzki-Heinemann K., Naim H.Y., von Köckritz-Blickwede M. Staphylococcus aureus Infection Influences the Function of Intestinal Cells by Altering the Lipid Raft-Dependent Sorting of Sucrase-Isomaltase. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2021, no. 9. doi: 10.3389/fcell.2021.699970
31. Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.*, 2006, vol. 31, pp. 137–155. doi: 10.1007/BF02705243
32. Peterson M.M., Mack J.L., Hall P.R., Alsup A.A., Alexander S.M., Sully E.K., Sawires Y.S., Cheung A.L., Otto M., Gresham H.D. Apolipoprotein B Is an innate barrier against invasive Staphylococcus aureus infection. *Cell. Host. Microbe*, 2008, vol. 4, no. 6, pp. 555–566. doi: 10.1016/j.chom.2008.10.001
33. Ruetz T., Cornick S., Guttman J.A. The Spectrin Cytoskeleton Is Crucial for Adherent and Invasive Bacterial Pathogenesis. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5: e19940. doi: 10.1371/journal.pone.0019940
34. Scheld W.M., Strunk R.W., Balian G., Calderone R.A. Microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocarditis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1988, vol. 180, no. 3, pp. 474–482. doi: 10.3181/00379727-180-42205
35. Shui W., Gilmore S.A., Sheu L., Liu J., Keasling J.D., Bertozzi C.R. Quantitative proteomic profiling of host-pathogen interactions: the macrophage response to Mycobacterium tuberculosis lipids. *J. Proteome Res.*, 2009, vol. 8, no. 1, pp. 282–289. doi: 10.1021/pr800422e
36. Srinivasan Y., Elmer L., Davis J., Bennett V., Angelides K. Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature*, 1988, no. 333, pp. 177–180.
37. Suzuki M., Miyazaki K., Ikeda M., Kawaguchi Y., Sakai O. F-actin network may regulate a Cl⁻ channel in renal proximal tubule cells. *J. Membr. Biol.*, 1993, no. 134, pp. 31–39. doi: 10.1007/BF00233473
38. Vozandychova V., Stojkova P., Hercik K., Rehulka P., Stulik J. The Ubiquitination System within Bacterial Host-Pathogen Interactions. *Microorganisms*, 2021, no. 9: 638. doi: 10.3390/microorganisms9030638
39. Wada T., Aiba Y., Shimizu K., Takagi T., Miwa A., Koga Y. The Therapeutic Effect of Bovine Lactoferrin in the Host Infected with Helicobacter pylori. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1999, vol. 34, no. 3, pp. 238–243. doi: 10.1080/00365529950173627
40. Xu Y.Y., Samaranyake Y.H., Samaranyake L.P., Nikawa H. In vitro susceptibility of Candida species to lactoferrin. *Med. Mycol.*, 1999, vol. 37, no. 1, pp. 35–41. doi: 10.1046/j.1365-280x.1999.00198.x
41. Yu F., He M., Li J., Wang H., Chen S., Zhang X., Zhang H., Duan G., Zhang R. Differential expression of α -enolase in clinical gastric tissues and cultured normal/cancer cells in response to Helicobacter pylori infection and cagA transfection. *Medicina*, 2022, vol. 58, no. 10. doi: 10.3390/medicina58101453

Авторы:

Комиссарова Д.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией эколого-гигиенических аспектов обитаемости ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия;

Ларина И.М., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией протеомики ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия;

Пастушкова Л.Х., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории протеомики ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия;

Каширина Д.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протеомики ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия;

Усанова Н.А., старший научный сотрудник лаборатории микробной экологии человека ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия;

Ильин В.К., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией микробной экологии человека ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия.

Authors:

Komissarova D.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of Laboratory of Ecological and Hygienic Aspects of Habitability, State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Larina I.M., DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Head of Laboratory of Proteomics, State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Pastushkova L.H., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Proteomics, State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Kashirina D.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Proteomics, State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Usanova N.A., Senior Researcher, Laboratory of Human Microbial Ecology, State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Ilyin V.K., DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Head of Department of Sanitary and Hygienic Safety of Humans in Artificial Habitats, Leading Researcher, Head of Laboratory of Human Microbial Ecology, State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

И.С. Андреева¹, В.В. Морозова², А.С. Кабанов¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Распространенность дрожжевых инфекций значительно возросла за последние несколько десятилетий, все более актуальна проблема резистентности выделяемых возбудителей к антимикробным препаратам. К часто встречающимся патогенным грибам относятся дрожжи рода *Candida*. Доминирующим видом, как в поверхностных, так и в инвазивных инфекционных процессах, является вид *Candida albicans*. В настоящем сообщении приводятся данные по идентификации и определению устойчивости к антимикотическим препаратам изолятов дрожжей, выделенных из клинического материала от пациентки с хроническим бронхитом и пациента с генерализованной дрожжевой инфекцией. В результате геномной идентификации штамм, вызвавший генерализованную инфекцию, определен как *Candida utilis*, что подтверждает литературные данные о все большем распространении этого вида, считавшегося редко встречающимся возбудителем инвазивных процессов, в качестве нового опасного патогена. Тестирование на чувствительность к антимикотикам выявило резистентность штамма *C. utilis* к широко применяемым противогрибковым препаратам, таким как кетоконазол, итраконазол и флуконазол, слабую чувствительность к клотримазолу, нистатину и амфотерицину В. Штамм из материала пациентки с хроническим бронхитом идентифицирован как *C. africana*, считающийся разновидностью *C. albicans*. За исключением итраконазола, штамм проявил чувствительность, выраженную в разной степени, к пяти антимикотическим препаратам, использованным в опыте. Оба выделенных штамма дрожжей обладали активным ростом при повышенной температуре, способностью к образованию капсулы, формированию гифальных проростков и биопленок — признаками, отличающими потенциально патогенные штаммы кандид от сапротрофных штаммов. Комбинированная противогрибковая терапия включает в себя применение пробиотических препаратов на основе микроорганизмов, проявляющих антагонизм относительно грибов. В настоящей работе показано эффективное ингибирующее влияние на активность роста

Адрес для переписки:

Андреева Ирина Сергеевна
630559, Россия, Новосибирская область, п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».
Тел.: 8 (913) 946-58-22.
E-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Contacts:

Irina S. Andreeva
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (913) 946-58-22.
E-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

Для цитирования:

Андреева И.С., Морозова В.В., Кабанов А.С. Идентификация и определение резистентности к антимикотическим факторам клинических изолятов дрожжей, выделенных при заболевании дыхательных путей // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 961–970.
doi: 10.15789/2220-7619-IAD-17630

Citation:

Andreeva I.S., Morozova V.V., Kabanov A.S. Identification and determination of resistance to antimycotic factors in yeast clinical isolates during respiratory diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 961–970. doi: 10.15789/2220-7619-IAD-17630

Генетический анализ штаммов дрожжей проведен при частичном финансировании государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300043-8, а также при поддержке федерального проекта «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» в рамках «Создание национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов».

Genetic analysis of yeast strains was carried out under partial funding of the state assignment of IHBFM SB RAS No. 121031300043-8, and also supported by the federal project "Sanitary shield of the country — safety for health (prevention, detection, response)" within the framework of "Creation of a national interactive catalogue of pathogenic microorganisms and biotoxins".

исследуемых штаммов патогенных дрожжей и типовой контрольный штамм *C. albicans* Y-583 секретлируемых водорастворимых метаболитов спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, антисептиков «Октенисепт» и «Хлоргексидин», а также масляных экстрактов розмарина и сандала.

Ключевые слова: дрожжеподобные грибы, кандидоз, бронхолегочная инфекция, клинические изоляты, *Candida utilis*, *Candida albicans*, резистентность к антимикотикам.

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF RESISTANCE TO ANTIMYCOTIC FACTORS IN YEAST CLINICAL ISOLATES DURING RESPIRATORY DISEASES

Andreeva I.S.^a, Morozova V.V.^b, Kabanov A.S.^a

^a State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^b Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The prevalence of yeast infections has increased significantly over the past few decades, with resistance of isolated pathogens to antimicrobial agents becoming progressively more pressing. Commonly occurring pathogenic yeasts include genus *Candida*, with *C. albicans* species being the dominant in both superficial and invasive infectious processes. This report presents data on the identification and determination of antimycotic drug resistance for yeast isolates obtained from clinical material of a patient with chronic bronchitis and a patient with generalized fungal infection. As a result of genomic identification, the strain causing the generalized infection was identified as *Candida utilis*, confirming the literature data on its increasing prevalence, considered a rare pathogen of invasive processes, as a new dangerous pathogen. Antimycotic susceptibility testing revealed resistance of *C. utilis* strain to commonly used antifungal drugs such as ketoconazole, itraconazole and fluconazole, weak sensitivity to clotrimazole, nystatin and amphotericin B. The strain from a patient with chronic bronchitis was identified as *C. africana*, considered to be a *C. albicans* species. Excepting itraconazole, the strain showed varying sensitivity to the five antimycotic drugs used in the experiment. Both isolated yeast strains actively grew at elevated temperature, were able to form a capsule, hyphal sprouts and biofilms, features which distinguish potentially pathogenic *Candida* from saprotrophic strains. Combined antifungal therapy includes the use of probiotic preparations based on microorganisms that exhibit antagonism against fungi. The present work shows an effective inhibitory effect from secreted water-soluble metabolites of spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, antiseptics "Octenisept" and "Chlorhexidine", as well as rosemary and sandalwood oil extracts on growth activity of the studied pathogenic yeast strains and a typical control strain of *C. albicans* Y-583.

Key words: yeast-like fungi, candidiasis, bronchopulmonary infection, clinical isolates, *Candida utilis*, *Candida albicans*, resistance to antimycotics.

Введение

Дрожжеподобные грибы широко распространены во внешней среде, на листьях и плодах растений, в почве, воде, в организме человека и животных, являются эндосимбионтами насекомых, считаются условно-патогенными, но при определенных условиях способны вызывать как поверхностные, так и инвазивные инфекционные процессы [16]. Кандидамикоз (кандидоз) — известное заболевание кожи и слизистых оболочек полости рта, урогенитального тракта, имеет локальный характер, но при ослаблении иммунитета, способен переходить в генерализованную форму, вызывать опасные для жизни инфекции кровотока, инвазивный кандидоз внутренних органов [14]. Грибы рода *Candida* являются сапротрофами, входят в состав постоянно живущих в микробиоме здоровых людей микроорганизмов [21], к патогенезу имеет отношение 21 вид, среди которых доминирующим является оппортунистический гриб *C. albicans*, определяемый в 90% случаев поверхностного и инвазивного кандидомикоза [11]. Реже среди возбудителей инфекционных про-

цессов встречаются виды этого рода *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* [11]. Развитие инфекционных процессов, вызванных *Candida utilis*, до недавнего времени были крайне редки: в литературе встречались единичные публикации, где была показана патогенность этого вида. *C. utilis*, преимущественно, встречалась в крови у детей в возрасте 0–3 месяцев, длительно находящихся в отделении интенсивной терапии, обнаружена также у людей с ослабленным иммунитетом [4, 29].

Развитию кандидозной инфекции способствуют несколько факторов и видов активности, которые усиливают патогенный потенциал грибка. Среди них наличие молекул адгезии, формирование биопленки [13], способность проникновения кандид в тканевые структуры благодаря морфологической трансформации клеток в гифальную форму [18]. Гифы в тканях распространяются быстрее, чем дрожжевая форма, что облегчает миграцию кандид через поврежденные ткани и является признаком начала образования биопленки с последующим накоплением внеклеточного матрикса [2]. Наличие биопленки

уменьшает восприимчивость кандид к антимикотическим препаратам, защищает от факторов иммунитета. Возможность горизонтального переноса генов в биопленке обеспечивает более успешную адаптацию к условиям среды, способствует развитию полирезистентности кандид к антимикотическим препаратам, что затрудняет лекарственную терапию [15, 17, 27]. Перспективным направлением для комплексного лечения при хронических инфекционных заболеваниях, включая кандидоз, может стать применение непатогенных бактерий-антагонистов рода *Bacillus* или других микроорганизмов, используемых в качестве пробиотиков [20, 28].

Анализ видового состава и свойств патогенных дрожжеподобных грибов, исследование действия антимикотических препаратов на биопленки, сформированные грибами рода *Candida*, определение механизмов возникновения резистентности к антимикотическим препаратам, поиск новых эффективных антигрибковых препаратов является актуальной задачей современной медицины [8].

Целью настоящей работы является идентификация и определение резистентности к антимикотическим препаратам клинических изолятов дрожжеподобных грибов, ставших причиной тяжелых хронических, генерализованных заболеваний бронхолегочной системы.

Материалы и методы

Дрожжеподобные грибы, использованные в работе: изолят дрожжей Y-1370, выделенный из клинического материала пациента (57 лет) с генерализованной инфекцией и летальным исходом; изолят дрожжей Y-1395, выделенный из мокроты пациентки (78 лет) с диагнозом «Хронический бронхит»; контрольный коллекционный штамм *Candida albicans* Y-583.

Штаммы бактерий антагонистов: *Bacillus subtilis* B-652; *Bacillus licheniformis* B-847, *Bacillus subtilis* B-1376.

Все перечисленные микроорганизмы хранятся в составе коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для культивирования дрожжей использовали кукурузный агар (г/л): кукурузная мука — 40, пептон — 50, глюкоза — 20, агар — 15, водопроводная вода до 1 л, pH 6,5, и среду Сабуро; для бактерий применяли среду ГРМ (среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Инкубирование высевов проводили при 37°C в течение 24–48 ч. Выросшие отдельные колонии микроорганизмов использовали для дальнейшего их изучения.

Морфологию выделенных микроорганизмов исследовали при наблюдении живых и фиксированных, окрашенных препаратов клеток

с применением микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Физиологические и биохимические признаки изолятов дрожжей выполняли стандартными методами, способность к утилизации углеводов учитывали, высевая культуры на среды Гисса [10, 22].

Чувствительность к антибиотическим препаратам определяли диско-диффузионным методом с применением дисков производства НИЦФ (Россия), используя антимикотические препараты с концентрацией (мкг/диск): кетоконазол (20); итраконазол (10); флуконазол (40); клотримазол (10), нистатин (80 ЕД); амфотерицин В (40).

Определение чувствительности выделенных клинических изолятов к секретрируемым метаболитам штаммов бацилл *B. subtilis* и *B. licheniformis* выполняли методом отсроченного антагонизма [19].

Для определения чувствительности изолятов дрожжей Y-1370 и Y-1395 к антисептикам на агаризованную питательную среду Сабуро в чашку Петри вносили 100 мкл суточной исследуемой культуры с концентрацией клеток 10⁹ КОЕ/мл. В асептических условиях в засеянной среде делали лунки и вносили в каждую по 50 мкл препаратов: «Октенисепт» (Octenisept, Германия), «Хлоргексидин биглюканат» 0,05% (Петрофарм, Россия); настойка календулы (ООО «Гиппократ», Россия); настойка эвкалипта (ООО «Косметик Ленд», Россия); 10% масляные экстракты розмарина, сандала, лаванды (Китай). В качестве контроля в лунки вносили по 50 мкл 70% этилового спирта и физиологического раствора. Инкубировали высевы в течение 24–48 ч, при температуре 37°C. Чувствительность микроорганизма к препарату определяли по наличию и размеру зоны угнетения роста вокруг лунки с антисептиком (использованы средние данные по трем повторам опыта).

Таксономическую принадлежность изолятов определяли по суммарным результатам фенотипического и геномного анализа. Для идентификации исследуемых дрожжей молекулярно-генетическими методами использовали ITS (последовательность межгенного рибосомального спейсера). ДНК дрожжей выделяли из суспензий микроорганизмов с использованием набора «ДНК-технология» (ДНК-Технология, Россия) по методике производителя. Реакцию амплификации ITS-фрагмента дрожжевой ДНК вели с использованием олигонуклеотидов ITS1 и ITS4 для первого раунда ПЦР (полученный фрагмент ~600 н.п.), ITS3 и ITS4 для второго раунда ПЦР (~300 н.п.) [3]. В качестве матрицы использовали выделенную геномную ДНК, реакцию вели с использованием SP-Taq-ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия). Полученные ПЦР-фрагменты очищали элюцией из GTG-

агарозы (Lonza, Израиль). Реакцию секвенирования полученных ПЦР-фрагментов проводили с использованием тех же олигонуклеотидов и реактива BigDye v.3.1 (Applied Biosystems, США) в стандартных условиях. Электрофоретическое разделение продуктов реакции секвенирования вели с использованием прибора «ABI Sequencing Analyzer 3500». Полученные последовательности анализировали с использованием программного обеспечения ABI Sequence Scanner и FinchTV 4.1. Сравнение последовательностей с имеющимися в базе данных NCBI GenBank database (ncbi.nlm.nih.gov) референсными последовательностями рибосомальных спейсеров дрожжей проводили с использованием алгоритма BLASTN. Филогенетический анализ для наиболее близких к исследуемым последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.21.

Результаты

Изолят Y-1370 выделен при анализе микробной генерализованной инфекции пациента с диагнозом пневмония и летальным исходом. Пять образцов материалов от больного (моча, смывы из ротоглотки, носоглотки) в изобилии содержали эукариотические клетки капсулированных, почкующихся дрожжеподобных грибов на разных стадиях жизненного цикла, с диаметром до 5 мкм (рис. 1А), образующих на агаре Сабуро белые, пастообразной консистенции, куполообразные, непрозрачные колонии со специфическим (дрожжевым) запахом (рис. 1Б). Пять полученных чистых культур оказались идентичными, с положительной

окраской по Граму, отрицательной реакцией по уреазе. Выделенные культуры проявили способность к анаэробному росту, ферментации глюкозы, мальтозы и лактозы до кислоты, в результате геномного анализа они идентифицированы как принадлежащие к виду *Cyberlindnera jadinii* (телеморфа *Candida utilis*).

Изолят дрожжей Y-1395 выделен при высеве мокроты пациентки с хроническим бронхитом на среду Сабуро в виде множества колоний белого цвета, куполообразных, матовых, непрозрачных, пастообразной консистенции, образованных грамположительными, капсулированными, почкующимися клетками, размером 2–5 мкм, активно утилизирующими глюкозу и сахарозу. От вида *Candida albicans* данный изолят дрожжей отличала утилизация сахарозы, неспособность к усвоению мальтозы и к росту при 42–45°C. В результате геномной и фенотипической идентификации изолят дрожжей Y-1395 определен как относящийся к виду *Candida africana* — дрожжеподобным оппортунистическим грибам, также имеющим клиническое значение в развитии кандидозов [25].

Идентификация изолятов дрожжей с использованием последовательностей межгенных рибосомальных спейсеров приведена на рис. 2 и 3. Последовательности ITS-фрагментов приведены на рис. 4 и 5.

В зависимости от температурных условий роста кандиды способны менять морфологию клеток. Диапазон температур от 37 до 40°C содействует образованию гифальных форм, характерных для инвазивных процессов. Исследуемые штаммы кандид хорошо

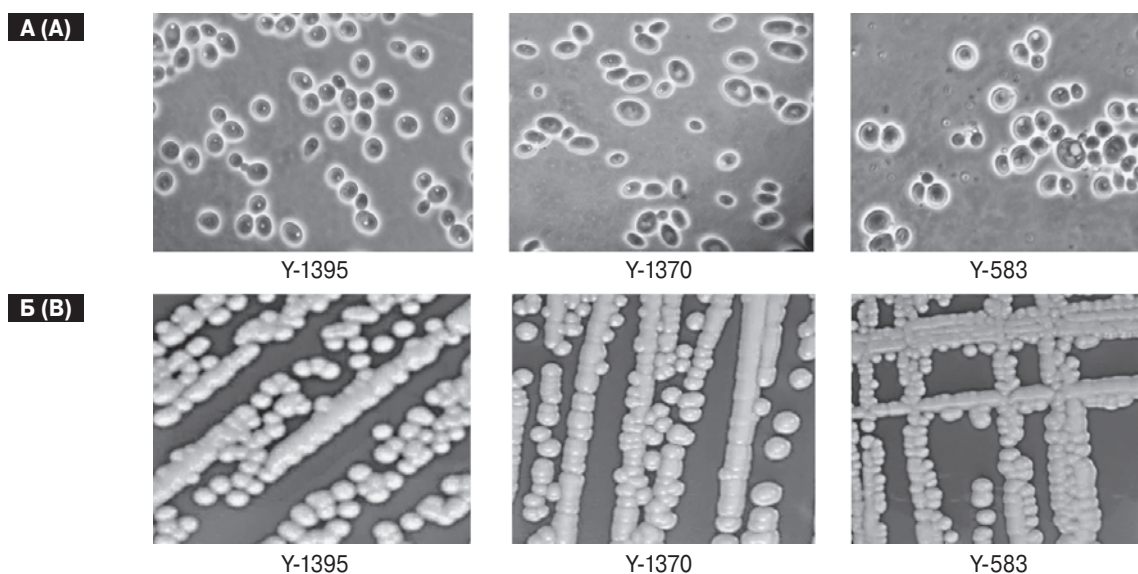


Рисунок 1. Морфология клеток (А, ×2500) и колоний (Б) штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395, Y-583 (типовой штамм *Candida albicans*)

Figure 1. Cell (A, ×2500) and colony (B) morphology of yeast strains Y-1370, Y-1395, and Y-583 (type strain *Candida albicans*)

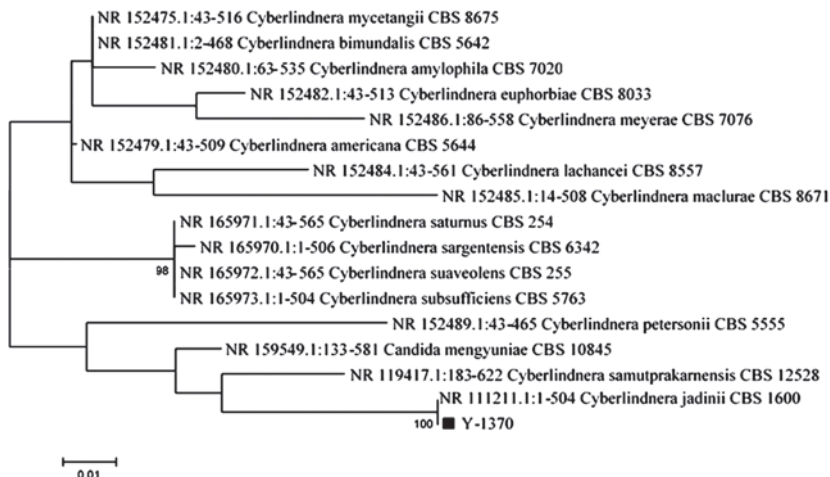


Рисунок 2. Филогенетический анализ ITS-последовательности штамма Y-1370. Выравнивание последовательностей произведено алгоритмом ClustalW, филогенетическое дерево построено методом наибольшего правдоподобия, количество реплик 1000. Анализируемая последовательность отмечена черным квадратом

Figure 2. Phylogenetic analysis of strain Y-1395 ITS-sequence. The alignment was performed by the ClustalW algorithm, the phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method, with 1000 replicates. The analyzed sequence is depicted as a black box

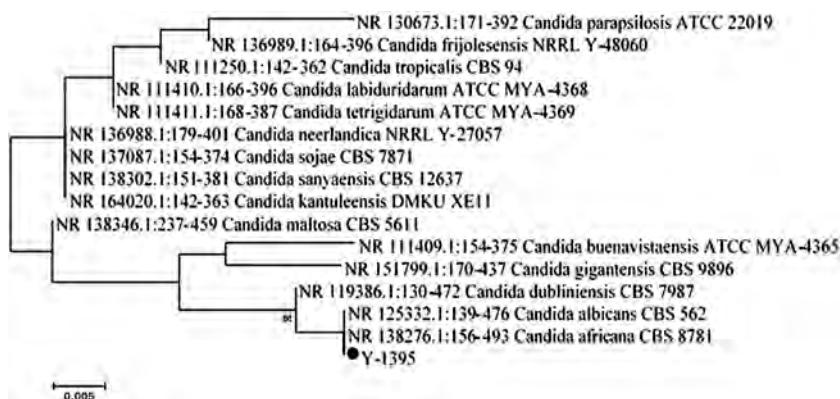


Рисунок 3. Филогенетический анализ ITS-последовательности для штамма Y-1395. Выравнивание последовательностей произведено алгоритмом ClustalW, филогенетическое дерево построено методом наибольшего правдоподобия, количество реплик 1000. Анализируемая последовательность отмечена черным кружком

Figure 3. Phylogenetic analysis of strain Y-1370 ITS-sequence. Alignment was performed by the ClustalW algorithm, phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method, with 1000 replicates. The analyzed sequence is denoted by a black circle

```
>Y-1370
CTACTGATTGAGGTCAGCTTAGAAGGTTGTTTCAGCCGAGCTCTGCCTGGAAGTCTGTCTGAAAA
ATAACGAGTTGGCAGAACCTAATACATATTTTCGGCCAGAGGATTTCTAGGGGGAGCTCTGCC
TAGAGTATTTCAAGTTAACACAGAGTATCACTCAATACCAAGTCCCCTAGAGGATCTTGAGAGA
GAAATGACGCTCAAACAGGCATGCTCTGGAATGCCAGAGAGCGCAATATGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCAGAAAACCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTG
CGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATTAATAATCAAATGACTAGTTTCTAG
AGAAAATAAATTTCTGTGTTTAAAACCTTTGGCAGAGCCAAAGCAAAGAAGCAAATACTAG
TGTATTGTTGGAGCCGCTAGAACCCAGGCCAGGTTCTCTAATGATCCTTCCGCGAGTTTC
ACCTACGAAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTA
```

Рисунок 4. Нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента штамма дрожжей Y-1370

Figure 4. Nucleotide sequence of fungal strain Y-1370ITS fragment

>Y-1395
 СТАСТГАТТГАГГТСААГТТГААГАТАТАСГТГГТГГАСГТТАСГСГСГААГСААТГТТТТ
 ГГТТАГАССТААГСАТТГТCAAAGCGATCCCGCCTTACCACTACCGTCTTCAAGCAACCCA
 АГТСГТАТТГСТСААСАСАААССААССАААССАААССАААССАААССАААССАААССААА
 СТССГГААТАССАААССАААССАААССАААССАААССАААССАААССАААССАААССААА
 САТАТАСГТАТСГАТТТТГСГТТ
 ААГТТТТГАСТАТТА

Рисунок 5. Нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента штамма дрожжей Y-1395

Figure 5. Nucleotide sequence of fungal strain Y-1395 ITS fragment



Рисунок 6. Образование биопленки и гифальных проростков у дрожжеподобных клеток кандид при культивировании на кукурузном агаре; ×2500

Figure 6. Hyphal sprout formation in *Candida* yeast-like cells cultured on corn agar; ×2500

Таблица 1. Определение чувствительности штаммов исследуемых грибов к антимикотическим препаратам диско-диффузионным методом

Table 1. Determination of sensitivity of strains of the studied fungi to antimycotic drugs by disk-diffusion method

Штамм Strain	Препараты антимикотиков/зона подавления роста дрожжей (мм) Antimycotic agents/growth suppression zone of fungal strains (mm)					
	Кетоконазол Ketokonazol	Итраконазол itraconazole	Флуконазол Fluconazole	Клотримазол Clotrimazole	Нистатин Nystatin	Амфотерицин В Amphotericin B
Y-1370	R	R	R	I	I	S
Y-1395	S	R	S	S	I	I
Y-583	R	R	R	R	I	I

Примечание. S (Susceptible) — чувствительный; R (Resistant) — резистентный; I (Intermediate) — умеренно резистентный.

Note. S (Susceptible) — sensitive; R (Resistant) — resistant; I (Intermediate) — moderately resistant.

Таблица 2. Ингибирующее влияние на клетки штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395, Y-583 секретлируемых метаболитов штаммов спорообразующих бактерий

Table 2. Inhibitory effect of secreted metabolites from spore-forming bacterial strains on yeast Y-1370, Y-1395, and Y-583 strains

Штамм Strain	Штаммы антагонисты/зона подавления роста (мм) Antagonist strains/growth suppression zone (mm)		
	<i>B. subtilis</i> B-1376	<i>B. licheniformis</i> B-847	<i>Bacillus subtilis</i> B-652
Y-1370	35±1,0	35±1,0	35±1,0
Y-1395	20±1,0	35±1,0	35±1,0
Y-583	30±1,0	15±0,7	20±1,0

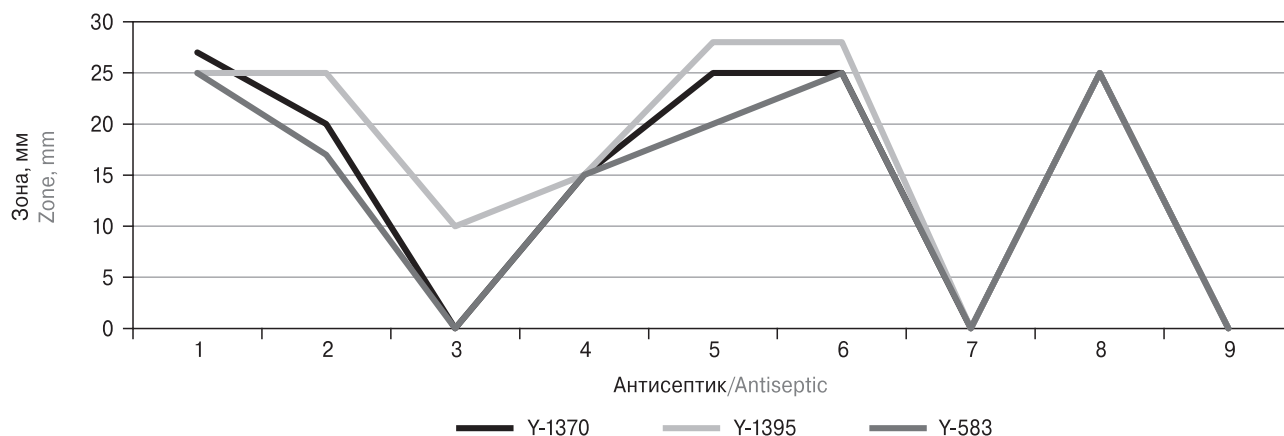


Рисунок 7. Определение чувствительности штаммов исследуемых грибов к антисептикам

Figure 7. Determination of antiseptics fungal strain sensitivity

Примечание. 1 — «Октенисепт»; 2 — «Хлоргексидин биглюканат» 0,05%; 3 — настойка календулы; 4 — настойка эвкалипта; 5 — масляный экстракт розмарина, 6 — масляный экстракт сандала, 7 — масляный экстракт лаванды; 8 — 70% этанол; 9 — физиологический раствор.

Note. 1 — “Octenisept”; 2 — “Chlorhexidine biglucanate” 0,05%; 3 — calendula tincture; 4 — eucalyptus tincture; 5 — rosemary oil extract, 6 — sandalwood oil extract, 7 — lavender oil extract; 8 — 70% ethanol; 9 — physiological solution.

росли при температуре 37°C, клетки при росте на кукурузном агаре активно образовывали гифальные проростки и формировали биопленки (рис. 6). Фенотипическая гибкость является важным фактором вирулентности кандид, обеспечивающим вторжение в эпителий, распространение по организму и выживание в различных нишах макроорганизма [21]. Выживанию клеток дрожжей в неблагоприятных условиях способствует развитая капсула, в состоянии биопленки обеспечивающая клеткам защиту от воздействия иммунитета и антимикотических препаратов. Все эти свойства — активный рост при повышенной температуре, способность к образованию капсулы, формированию гифальных проростков и биопленок, характерные и для изучаемых культур, — относятся к признакам патогенности и отличают потенциально патогенные штаммы кандид от сапротрофных штаммов.

Определение чувствительности к антимикотикам показало, что штамм *C. utilis* Y-1370 резистентен к кетоконазолу, итраконазолу и флуконазолу, обладает слабо выраженной чувствительностью к клотримазолу и нистатину, несколько в большей степени — к амфотерицину В, что делает эти препараты малоэффективными по отношению к данному патогену. Типовой штамм *C. albicans* Y-583 по чувствительности к антимикотикам был сходен со штаммом Y-1370, в то время как штамм Y-1395 проявил устойчивость к интраконазолу, к остальным использованным препаратам был чувствителен в разной степени (табл. 1). Кетоконазол, флуконазол и клотримазол были наиболее эффективными относительно штамма Y-1395.

Спорообразующие бактерии *B. subtilis* B-1376, *B. licheniformis* B-847, *B. subtilis* B-652 тестированы на наличие антигрибковой активности относительно штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395 и типового контрольного штамма *C. albicans* Y-583. Показано, что клинические изоляты Y-1370, Y-1395 проявили высокую чувствительность к секретиремым метаболитам всех трех бацилл (табл. 2), зоны угнетения роста достигали 35 мм.

Реакция на действие антисептиков, включая растительные экстракты, у всех трех штаммов Y-1370, Y-1395 и Y-583 была схожей: показана высокая чувствительность к препаратам «Октенисепт» и «Хлоргексидин», а также к масляным экстрактам розмарина, сандала и контрольному раствору 70% этанола (рис. 7). При использовании настойки календулы и масляного экстракта лаванды получен отрицательный результат, зоны угнетения роста культур вокруг лунок с этими препаратами отсутствовали, как и в контрольном варианте с применением физиологического раствора.

Обсуждение

Наблюдаемое в настоящее время все большее распространение дрожжевых грибов рода *Candida* связывают с нерациональным использованием антимикотиков, неблагоприятным влиянием среды на иммунную систему, длительной госпитализацией, несъемными катетерами и другими отягощающими факторами. У пациентов со СПИД, после химиотерапии онкологического заболевания или трансплантации органов также существует высокая вероятность развития генерализованного кандидамикоза вплоть до септицемии [21]. При инфекционных заболеваниях ды-

хательной системы для грибов рода *Candida* показана высокая частота встречаемости, как правило, в ассоциации с другими микроорганизмами [24]. Чаще всего сопутствующими микроорганизмами в ассоциации с кандидами были стрептококки, как мы и наблюдали при выделении из клинического материала изолята Y-1395, где в первичном высеве кроме дрожжей обнаружены неспороносные бактерии и гемолитические кокки.

Отмечается расширение видового состава штаммов кандид, ответственных за инфекционные процессы. Сравнительно недавно обнаруженный патоген *Candida auris* [7] все чаще становится причиной клинических инфекций, с риском развития генерализованных процессов и вероятностью летального исхода до 50%. Он отличается резистентностью ко многим антифунгальным препаратам [1]. За последние два десятилетия целый ряд видов рода *Candida* превратились из редких патогенов в наиболее важные и частые условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие кандидемию и инвазивный кандидоз у госпитализированных пациентов. Ранее не считавшиеся патогенными грибы вида *C. utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) все чаще являются возбудителями инвазивных процессов [12]. Факторами риска в таких случаях являлись ослабление иммунитета, длительная госпитализация, воздействие антибиотиков. Участились случаи грибковой инфекции *C. utilis* кровотока, связанные с длительным полностью имплантированным венозным катетером [9, 23]. В публикации 2021 г. Sreelekshmi T.S. с соавт. [4] вид *C. utilis* был объявлен новым грибковым патогеном в крови, выделен у детей в возрасте 0–3 месяцев, заболевание тяжело поддавалось лечению из-за резистентности возбудителей к антимикробным препаратам. В настоящем исследовании штамм дрожжей *C. utilis* выделен из мочи, носоглотки и зева пациента с генерализованной дрожжевой инфекцией с диагнозом пневмония. Штамм проявил резистентность к применяемому в настоящей работе антимикотикам, для его ингибирования необходим более эффективный подбор противогрибковых препаратов. Следует отметить, что полученные данные по резистентности исследуемых штаммов *Candida* к антимикотикам отличаются от приведенных сведений [6], рекомендуемых в качестве отличительных признаков для идентификации ряда видов этого рода. Вид *Candida africana*, к которому можно отнести изолят Y-1395, ранее был предложен в качестве нового, реже встречающегося и менее патогенного вида, однако дальнейшие филогенетические анализы подтвердили его статус как необычного варианта *C. albicans* [6], обнаруживаемого при вагинальных инфекциях [25]. Фенотипически изолят Y-1395 отличался от *C. albicans* замедленным образованием гиф, утилизацией сахарозы, отсутствием роста на сре-

де с мальтозой и при повышении температуры культивирования до 42–45°C, что соответствует признакам *C. africana* [6, 25].

Как выяснено, исследуемые штаммы дрожжей чувствительны к препарату «Октенисепт», предназначенному для обработки слизистых, пораженных грибками, и к антисептику «Хлоргексидин биглюканат» 0,05%, применяемому для обработки наружных покровов. Использованные настойки календулы и эвкалипта в соответствии с информацией на этикетке были приготовлены с применением 70% этанола, срок их годности не истек. Однако в отличие от 70% контрольного раствора этанола обе они не оказывали антигрибкового действия на исследуемые штаммы дрожжей, что может быть связано с особенностями технологии производства и хранения этих экстрактов. Эфирные масла хвойных и травянистых растений являются источниками антимикробных веществ широкого спектра действия и способны эффективно подавлять возбудителей микозов [5, 26]. В настоящей работе проявили эффективность против штаммов кандид *C. utilis* B-1370 и *C. africana* B-1395 масляные экстракты розмарина и сандала, к экстракту лаванды оба штамма были устойчивы.

Заключение

По результатам фенотипического и генетического анализа установлена таксономическая принадлежность дрожжеподобных грибов, выделенных из клинического материала пациентов с бронхолегочными заболеваниями, как относящихся к видам *C. utilis*, штамм Y-1370, и *C. africana*, штамм Y-1395. При определении резистентности штаммов к 6-ти широко применяемым на практике антимикотикам установлена чувствительность к пяти из них штамма *C. africana* Y-1395 и резистентность штамма *C. utilis* Y-1370. Подтверждены ранее имеющиеся сравнительно немногочисленные сведения о необходимости контролировать грибы вида *C. utilis* как патогены, способные вызвать тяжелые инфекционные заболевания до возможности летального исхода.

На примере клинических штаммов дрожжей Y-1370, Y-1395 и типового штамма *C. albicans* Y-583 показано, что исследованные антисептики, растительные и бактериальные препараты могут быть эффективно использованы в качестве дополнительных средств для терапии и профилактики кандидозов разного происхождения.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Буряк Г.А. и Емельяновой Е.К. за редакционные правки и техническую помощь в подготовке материалов статьи.

Список литературы/References

1. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей // М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 221 с. [Babieva I.P., Chernov I.Yu. Biology of yeast. Moscow: Partnership of Scientific Editions of KMK, 2004, 221 p. (In Russ.)]
2. Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенио Т.В., Зенкова В.А., Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С. Оценка антимикробной активности бактериального пробиотика *Bacillus subtilis* (штамм 534) // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. № 1. С. 41–47. [Gabrielyan N.I., Gorskaya E.M., Krupenio T.V., Zenkova V.A., Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Sumarukova I.G., Efremenkova O.V., Evlashkina V.F., Davydov D.S. Evaluation of the antimicrobial activity of the bacterial probiotic *Bacillus subtilis*-534. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2016, no. 1, pp. 41–47. (In Russ.)]
3. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Ожгибесов Г.П. Значение грибов рода *Candida* при воспалительных заболеваниях дыхательных путей // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 7. С. 10–12. [Godovalov A.P., Bykova L.P., Ozhgibesov G.P. Significance of *Candida* in inflammatory diseases of respiratory tract. *Sibirskij medicinskij zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2008, no. 7, pp. 10–12. (In Russ.)]
4. Капустина О.А., Карташова О.Л., Потехина Л.П., Уткина Т.М. Биопленкообразование *Candida* spp., выделенных из разных биотопов тела человека // Проблемы медицинской микологии. 2011. Т. 13, № 2. С. 81–82. [Kapustina O.A., Kartashova O.L., Potekhina L.P., Utkina T.M. Biofilm formation of *Candida* isolated from different human's biotopes. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2011, vol. 13, no. 2, pp. 81–82. (In Russ.)]
5. Кольцов И.П., Стрельникова Н.В., Витько Е.В., Витько Л.Г., Савлюк О.Е. Микробиологические свойства условно-патогенных сахаромыцетов рода *Candida* при хронических, рецидивирующих инфекционно-воспалительных процессах (обзор литературы) // Тихоокеанский медицинский журнал. 2023. № 1. С. 19–26. [Koltsov I.P., Strelnikova N.V., Vitko E.V., Vitko L.G., Savlyuk O.E. Microbiological properties of opportunistic saccharomycetes of the genus *Candida* in chronic, recurrent infectious inflammatory processes (literature review). *Tihookeanskiy medicinskij zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2023, no. 1, pp. 19–26. (In Russ.)] doi: 10.34215/1609-1175-2023-1-19-26
6. Лыков И.Н., Викторова А.С., Муравьева А.С., Петелина К.О. Скрининг эфирных масел на предмет их антимикробной активности // Международный научно-исследовательский журнал. 2023. № 8 (110), Часть 2. С. 19–23. [Lykov I.N., Viktorova A.S., Muravyeva A.S., Petelina K.O. Screening of essential oils for their antimicrobial activity. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*, 2023, no. 8 (110), part 2, pp. 19–23. (In Russ.)] doi: 10.23670/IRJ.2021.110.8.039
7. Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Ефименко Т.А., Зенкова В.А., Катруха Г.С., Резникова М.И., Королев А.М., Боршевская Л.Н., Тарасова О.Д., Синеокий С.П., Ефременкова О.В. Новые антибиотики, образуемые штаммами *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2014. Т. 83, № 5. С. 445–450. [Malanicheva I.A., Kozlov D.G., Efimenko T.A., Zenkova V.A., Katrukha G.S., Reznikova M.I., Korolev A.M., Borshchevskaya L.N., Tarasova O.D., Sineokii S.P., Efremenkova O.V. New antibiotics produced by *Bacillus subtilis* strains. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya*, 2014, vol. 83, no. 5, pp. 445–450. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0026365614040119
8. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с. [MUK 4.2.1890-04 Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodical instructions. Moscow: Federal Center of Gossanepidnadzor of the Ministry of Health of Russia, 2004. 91 p. (In Russ.)]
9. Николаева Е.Н. Частота встречаемости в полости рта дрожжеподобных грибов рода *Candida* при остром респираторном заболевании // Международный научно-исследовательский журнал. 2013. № 5. С. 69–70. [Nikolaeva E.N. The frequency of occurrence in the mouth yeast-like fungi of the genus *Candida* with acute respiratory diseases. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*, 2013, vol. 12, no. 5, pp. 69–70. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/item.asp?id=19077906>
10. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001. 468 с. [Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. The determination of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Moscow: Mir, 2001. 468 p. (In Russ.)]
11. Сачивкина Н.П., Ленченко Е.М. Эффективные способы идентификации дрожжеподобных грибов рода *Candida* // Ветеринария. 2019. № 2. С. 25–28. [Sachivkina N.P., Lenchenko E.M. Effective ways to identify yeast-like fungi of the genus *Candida*. *Veterinariya = Veterinary Medicine*, 2019, no. 2, pp. 25–28. (In Russ.)] doi: 10.30896/0042-4846.2019.22.2.25-28
12. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.Б. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада, 2001. 472 с. [Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.B. Candidiasis. Nature of infection, mechanisms of aggression and protection, laboratory diagnosis, clinic and treatment. Moscow: Triada, 2001, 472 p. (In Russ.)]
13. Шаповал О.Г., Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Мухамадиев Н.К., Раббимова Г.Т., Назирбеков М.Х. Антимикробная активность эфирных масел *Thymus serpyllum* L. и *Thymus marschallianus* Willd. в отношении *Candida albicans* // Химико-фармацевтический журнал. 2023. Т. 57, № 9. С. 26–31. [Shapoval O.G., Sheremeteyeva A.S., Durnova N.A., Mukhamadiev N.Q., Rabbimova G.T., Nazirbekov M.K. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd. against *Candida albicans*. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Chemical and Pharmaceutical Journal*, 2023, vol. 57, no. 9, pp. 26–31. (In Russ.)] doi: 10.30906/0023-1134-2023-57-9-26-31
14. Borman A.M., Szekely A., Linton C.J., Palmer M.D., Brown Ph., Johnson E.M. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 3, pp. 967–972. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03619
15. Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A.B., Monk B.C. Oral candida: clearance, colonization, or candidiasis? *J. Dent. Res.*, 1995, vol. 74, no. 5, pp. 1152–1161. doi: 10.1177/00220345950740050301

16. Cavalheiro M., Teixeira M.C. Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Front. Med. (Lausanne)*, 2018, vol. 5: 28. doi: 10.3389/fmed.2018.00028
17. Cortegiani A., Misseri G., Fasciana T., Giammanco A., Giarratano A., Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J. Intensive Care*, 2018, vol. 6: 69. doi: 10.1186/s40560-018-0342-4
18. Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2008, vol. 2, no. 2, pp. 113–118. doi: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x
19. Gow N.A.R., Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, 2017, vol. 163, no. 8, pp. 1145–1147. doi: 10.1099/mic.0.000499
20. Jindal N., Arora S., Dhuria N., Arora D. Cyberlindnera (*Pichia*) *fabianii* infection in a neutropenic child: importance of molecular identification. *J. Med. Microbiol. Case Reports*, 2015, vol. 2, no. 4, pp. 1–3. doi: 10.1099/jmmcr.0.000033
21. Lukić-Grič A., Mlinarić-Missoni E., Škarić I., Važić-Babić V., Svetec I.-K. *Candida utilis* candidaemia in neonatal patients. *J. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 60, no. 6, pp. 838–841. doi: 10.1099/jmm.0.023408-0
22. Mayer F.L., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 119–128. doi: 10.4161/viru.22913
23. Ostrosky-Zeichner L., Al-Obaidi M. Invasive fungal infections in the intensive care unit. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2017, vol. 31, no. 3, pp. 475–487. doi: 10.1016/j.idc.2017.05.005
24. Sahal G., Bilkay I.S. Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2018, vol. 51, no. 5, pp. 644–650. doi: 10.1590/0037-8682-0136-2018
25. Welsh R.M., Bentz M.L., Shams A., Houston H., Lyons A., Rose L.J., Livintseva A.P. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 10, pp. 2996–3005. doi: 10.1128/JCM.00921-17
26. Sherwood J., Gow N.A., Gooday G.W., Gregory D.W., Marshall D. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1992, vol. 30, no. 6, pp. 461–469. doi: 10.1080/02681219280000621
27. Shih M.H., Sheu M.M., Chen H.Y., Lin S.R. Fungal keratitis caused by *Candida utilis* – case report. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 1999, vol. 15, no. 3, pp. 171–174.
28. Sreelekshmi T.S., Ninan M.M., Premanand A., Chacko A., Sahni R.D., Michael J.S. *Candida utilis*: a rare cause of septicemia in children. *Access Microbiology*, 2021, vol. 3, no. 10: 000281. doi: 10.1099/acmi.0.000281
29. Treguier P., David M., Gargala G., Camus V., Stamatoullas A., Menard A.-L., Lenain P., Contentin N., Lemasle E., Lanic H., Tilly H., Jardin F., Lepretre S. *Cyberlindnera jadinii* (teleomorph *Candida utilis*) candidaemia in a patient with aplastic anaemia: a case report. *JMM Case Rep.*, 2018, vol. 5, no. 8: e005160. doi: 10.1099/jmmcr.0.00516

Авторы:

Андреева И.С., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;
Морозова В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Кабанов А.С., к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Россия.

Authors:

Andreeva I.S., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;
Morozova V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation;
Kabanov A.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Microorganisms Collection, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.04.2024
 Принята к печати 13.08.2024

Received 05.04.2024
 Accepted 13.08.2024

ОБЩИЙ ИММУНОГЛОБУЛИН Е КАК ПРЕДИКТОР НАЛИЧИЯ ЗООАНТРОПОНОЗА У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ: ОБСЕРВАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Е.В. Замятина^{1,2}, А.И. Шевела^{1,2}, И.А. Мандель^{3,4}, А.А. Сизов⁵, А.А. Степанов^{1,2},
Д.А. Сизов⁵, С.О. Даниленко⁶

¹ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

² ООО «Центр персонализированной медицины», г. Новосибирск, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁴ ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, Москва, Россия

⁵ ФГУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии РАН, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск Россия

⁶ ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Значительный вклад в поддержание общественного здоровья вносит контроль над зооантропонозными инфекциями — заболеваниями общими для животных и человека. Источником возбудителей для человека являются прежде всего те животные, с которыми он часто соприкасается во время сельскохозяйственных работ, на охоте, во время сбора грибов или ягод в лесу, а также в быту (собаки, кошки, другие домашние животные, грызуны). Исследование проведено на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН совместно с ООО «Центр персонализированной медицины» (ООО «ЦПМ»), г. Новосибирск, включило 111 здоровых добровольцев. Специфический иммунный ответ определяли к следующим зооантропонозам: токсокароз, токсоплазмоз, бруцеллез, листериоз, лептоспироз, описторхоз, определяемых на основании специфических иммуноглобулинов класса G (IgG). Сопоставляли данный паразитарный иммунный ответ с анамнезом и наличием ответа в виде иммуноглобулина E общего в сыворотке крови (oIgE). Из 111 обследуемых у 39 (35%) человек выявлены антипаразитарные IgG к следующим зоонозам: лептоспире, листерии, токсокаре, токсоплазме, описторху. Из данных 39 обследуемых 11 человек имели антитела к двум и более зооантропонозам, что составило 10% от общей когорты обследуемых. Уровень oIgE при наличии любого зооантропоноза значимо отличался от респондентов, не имеющих специфических IgG, $p = 0,0001$. Нормальный уровень oIgE был у 47 обследованных, из которых у 8 (17%) человек выявлены IgG к одному из исследуемых зооантропонозов. Повышенный уровень oIgE был у 64 обследованных, из которых у 31 (48%) человека выявлены IgG к одному или нескольким зооантропонозам, $p = 0,001$. Уровень oIgE может быть предиктором наличия зооантропоноза у условно здоровых лиц при уровне oIgE более 0,226 ОП (площадь под кривой 0,73 [0,62–0,83], $p = 0,0001$; чувствительность 76%, специфичность 62%). Выявленные критерии диагностического скрининга

Адрес для переписки:

Замятина Евгения Владимировна
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8,
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН.
Тел.: 8 (383) 333-15-94, 8 (923) 444-40-58.
E-mail: e_zamyat@mail.ru

Contacts:

Evgenia V. Zamyatina
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Akad. Lavrentyev pr., 8,
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB of the RAS.
Phone: +7 (383) 333-15-94, +7 (923) 444-40-58.
E-mail: e_zamyat@mail.ru

Для цитирования:

Замятина Е.В., Шевела А.И., Мандель И.А., Сизов А.А., Степанов А.А.,
Сизов Д.А., Даниленко С.О. Общий иммуноглобулин Е как предиктор
наличия зооантропоноза у условно здоровых лиц: обзорное
исследование // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 971–980.
doi: 10.15789/2220-7619-TIE-17631

Citation:

Zamyatina E.V., Shevela A.I., Mandel I.A., Sizov A.A., Stepanov A.A.,
Sizov D.A., Danilenko S.O. Total immunoglobulin E as a zoonanthroposis
predictor in healthy volunteers: an observational study // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5,
pp. 971–980. doi: 10.15789/2220-7619-TIE-17631

зооантропонозов могут ускорить дифференциальную диагностику состояний, связанных с неспецифическими жалобами. Необходимо проведение крупных проспективных рандомизированных исследований для выявления ранних диагностических критериев патологии.

Ключевые слова: зооноз, специфический иммуноглобулин класса G, общий иммуноглобулин E, аллергический анамнез, паразитарная инвазия, связь человека и животного.

TOTAL IMMUNOGLOBULIN E AS A ZOOANTHROPONOSIS PREDICTOR IN HEALTHY VOLUNTEERS: AN OBSERVATIONAL STUDY

Zamyatina E.V.^{a,b}, Shevela A.I.^{a,b}, Mandel I.A.^{c,d}, Sizov A.A.^e, Stepanov A.A.^{a,b}, Sizov D.A.^e, Danilenko S.O.^f

^a Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Center of New Medical Technologies, Novosibirsk, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^d Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^e Siberian Federal Research Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk, Russian Federation

^f Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Control of zoonotic infections common in animals and humans profoundly contributes to maintaining public health. The source of pathogens for humans is primarily presented by those animals with which they frequently come into contact during agricultural work, hunting, and gathering mushrooms or wild berries as well as in domestic settings (dogs, cats, other domestic animals, rodents). The study was conducted by the Center of New Medical Technologies, Novosibirsk, and involved 111 healthy volunteers. The specific immune response against the following zoonoses was analyzed: toxocarasis, toxoplasmosis, brucellosis, listeriosis, leptospirosis, and opisthorchiasis, based on specific IgG antibodies. Specific parasitic immune response was compared with the clinical data of the participants and blood IgE levels. Thirty-nine (35%) out of 111 participants had anti-parasitic IgG antibodies against the following zoonoses: leptospirosis, listeriosis, toxocarasis, toxoplasmosis, and opisthorchiasis. Among these 39 participants, 11 had antibodies specific to two or more zoonoses comprising 10% of the cohort. The IgE vs IgG level in the presence of any zoonosis significantly differed ($p = 0.0001$). Forty-seven participants had normal IgE levels, of whom 8 (17%) had IgG antibodies specific to one of the studied zoonoses. Sixty-four participants had elevated IgE levels, of whom 31 (48%) had IgG antibodies specific to one or more zoonoses, $p = 0.001$. The IgE level may be a predictor of the zoonoses in apparently healthy individuals at IgE level > 0.226 IU (area under the curve 0.73 [0.62–0.83], $p = 0.0001$; sensitivity 76%, specificity 62%). The identified diagnostic criteria for screening zoonoses can accelerate the differential diagnosis for conditions associated with non-specific complaints. Prospective randomized studies are needed to identify early pathology-related diagnostic criteria.

Key words: zoonoses, serum specific immunoglobulin G, total immunoglobulin E, allergic history, parasitic invasion, human-animal bond.

Введение

Дикая природа, люди и их домашние животные, а также окружающая среда неразрывно связаны между собой, поскольку они играют различную роль в передаче инфекционных заболеваний. Значительный вклад в поддержание общественного здоровья вносит контроль над зооантропонозными инфекциями — заболеваниями общими для животных и человека [2, 27]. Большинство инфекционных заболеваний, поражающих человека, имеют животное происхождение. В докладе «Азиатско-Тихоокеанская стратегия борьбы с возникающими болезнями 2010 г.» сообщается о том, что более 60% новых инфекций человека имеют зоонозную природу [37].

В исследовании таких инфекций крайне важен междисциплинарный подход и тесная кооперация между врачами различных специ-

альностей, ветеринарами, учеными-экологами, специалистами общественного здравоохранения, экспертами по дикой природе и многими другими [27, 33]. Известно около 200 заболеваний зооантропонозной природы, среди них наиболее распространенными являются токсоплазмоз, бруцеллез, лептоспироз, листериоз, токсокароз, различные геогельминты и другие. Источником возбудителей для человека являются прежде всего те животные, с которыми он часто соприкасается во время сельскохозяйственных работ, на охоте, во время сбора грибов или ягод в лесу, а также в быту (собаки, кошки, другие домашние животные, грызуны) [27, 29].

Симптомы большинства зооантропонозов неспецифичны и протекают под маской различных патологий, включающих бронхолегочные, гастроинтестинальные, ревматоидные, неврологические и иные заболевания.

Среди наиболее часто встречающихся клинико-лабораторных показателей можно отметить лихорадку, синдром интоксикации, кожные проявления, отек Квинке, признаки поражения респираторного тракта, диспепсический, абдоминальный, болевой, астеновегетативный синдромы, эозинофилию, лейкоцитоз, анемию [2, 21, 29, 36].

В рутинной клинической практике выявление данных инфекций затруднено и требует клинического мышления, поскольку инфекция зачастую протекает в латентной или хронической форме и диагностика, а также лечение клинических проявлений может идти по ложному пути [5, 8, 10, 18, 24].

Именно это и послужило целью нашего исследования. Латентному течению инфекций способствуют бесконтрольное применение антибактериальной терапии, иммунодефицитные состояния, что ведет к устойчивости некоторых форм инфекционных агентов. Латентное и хроническое течение может приводить к полиорганной недостаточности, невынашиванию беременности, длительно существующей суставной боли, которые интерпретируются ошибочно [5, 8, 14, 26].

При аллергических и паразитарных заболеваниях существует общий иммунный механизм патогенеза, включающий участие неспецифического иммуноглобулина класса E (oIgE). oIgE как маркер аллергических заболеваний и паразитарных инвазий, индуцирует активацию тучных клеток через связывание oIgE с его высокоаффинным рецептором FcεR1 на поверхности тучных клеток. После связывания oIgE тучные клетки высвобождают гистамин, протеазу тучных клеток, протеогликаны, цитокины и хемокины, запуская каскад патологических реакций и формируя локальное или системное воспаление [1, 3, 11, 12, 19, 20, 32].

В литературе имеются отдельные публикации, указывающие на участие oIgE в патогенезе паразитарного воспаления [22]. Но многие аспекты, оценивающие значимость oIgE при диагностике паразитарных инвазий, остаются открытыми, что и определило цель настоящего исследования.

Цель исследования состояла в выявлении взаимосвязи специфического иммунного ответа к зооантропонозным инфекциям с общим уровнем иммуноглобулина E у здоровых добровольцев на территории Новосибирской области.

Материалы и методы

Настоящее исследование было проведено на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН совместно с ООО «Центр персонализированной

медицины» (г. Новосибирск), где осуществлялся набор пациентов. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ЦПМ (протокол ЛЭК № 5 от 22.03.2023 г., Приказ о начале исследования № 231 от 01.06.2023 г.). Протокол исследования соответствовал этическим принципам Хельсинкской декларации 1975 г. Авторы следовали контрольному списку STROBE Checklist.

Методом случайной выборки были обследованы 111 человек из числа здоровых добровольцев, обратившихся в ООО «ЦПМ». Критериями включения являлось наличие письменного информированного согласия пациента. В исследование не включались лица с наличием острого инфекционного заболевания, а также лица, не подписавшие информированное согласие (ИС).

Наличие специфических иммуноглобулинов класса G к возбудителям зооантропонозных инфекций определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием следующих тест-систем: Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ; Описторх — IgG-ИФА-БЕСТ; Бруцелла-IgG-ИФА-БЕСТ (все производства «Вектор-Бест»); ВектоТоксо-IgG; Листерии O — IgG (производства «Галарт-Диагностикум»); KS-031 Лептоспироз-ИФА-IgG (производства ООО «Андромед»).

Определение общего иммуноглобулина класса E (oIgE) в сыворотке крови проводили с использованием диагностической тест-системы «IgE общий ИФА-Бест» («Вектор-Бест»). Все исследования проводили согласно прилагаемым к наборам инструкциям производителя.

В работе использовали следующее оборудование: термостатируемый шейкер Stat Fax 2200, автоматизированный планшетный промыватель «Проплан». Оптическую плотность (ОП) измеряли в двухволновом режиме 450 и 630 нм на спектрофотометре «Пикон». Нулевой уровень («бланк») задавали по воздуху. Рассчитывали ОПкрит. по формуле:

$$\text{ОПкрит.} = \text{ОПК} - (\text{ср.}) + 0,2,$$

где ОПК(ср.) — среднее значение ОП (ОПК) по двум лункам, а 0,2 — общепринятый эмпирический коэффициент. При значении ОП лунки больше ОПкрит, результат считали положительным. Повышенный уровень oIgE считали при значении более 0,22 ОП.

Для получения сыворотки периферическую кровь (в объеме 5 мл) забирали в соответствующие вакутейнеры (пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем). Пробирки инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч. Для лучшего выделения сыворотки образовавшийся сгусток фибрина отделяли от стенок пробирок стеклянной палоч-

кой. Готовую сыворотку собирали и хранили до использования при температуре не менее -18°C .

У всех рекрутированных в исследование лиц анализировали следующие характеристики: пол, возраст, место проживания, профессиональные вредности, аллергический анамнез, хронические заболевания, вторичные иммунодефициты в анамнезе, в том числе связанные с опухолевым процессом, операции, герпесвирусные инфекции, ВИЧ, аутоиммунные заболевания, а также заболевания глаз (uveиты, кератиты), в том числе операции на глазах с длительным реабилитационным периодом, привычное невынашивание беременности (самопроизвольные аборты), частоту использования антибактериальной терапии за последний год, последний прием антибиотиков. Наряду с этим анализировали узкоспецифические данные, характерные для зооантропонозов: употребление речной рыбы (рыбалка, заготовка), суши, готовых продуктов из свежей рыбы (рыбные полуфабрикаты, вяленая рыба/рыба к пиву; наличие домашних животных (кошки/собаки), последнее обследование животных на выявление токсокар, токсоплазм; употребление в пищу на регулярной основе молочных продуктов домашнего происхождения (сыры, сметана, кисломолочные продукты); наличие домашнего скота; наличие дачных участков и употребление «урожая с грядки».

Статистическая обработка данных была проведена в программе SPSS 26.0.0.0 (IBM, США). Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и 25–75 перцентилей [25; 75], категориальные — в виде абсолютного количества (n) и доли (%). Нормальность распределения величин проверяли при помощи теста Колмогорова–Смирнова. Корреляционный анализ проведен с использованием критерия Спирмена — ρ . Направление (прямая или обратная) и силу корреляционной связи определя-

ли по величине коэффициента. При $\rho > 0$, связь оценивали как прямую, при $\rho < 0$ — как обратную. Силу связи оценивали: $\rho < 0,3$ — очень слабая; $0,3-0,5$ — слабая; $0,5-0,7$ — средняя; $> 0,7$ — сильная. Определяли отношение шансов (ОШ), рассчитывали 95% доверительный интервал (ДИ) и статистическую значимость для сравнения двух групп бинарных данных с целью выявления тесноты связи «исхода» с присутствием или отсутствием определенного фактора (уровня oIgE нормального или повышенного). За «исход» было принято наличие иммунного ответа на один из зооантропонозов, диагностированного по уровню специфических IgG к одному из шести исследуемых заболеваний.

Достоверность различий величин для двух независимых групп проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Для категориальных признаков (в двух независимых группах) применяли критерий χ^2 с поправкой Йетса, точный критерий Фишера (если количество одной или нескольких ячеек в таблице меньше 5). Дискриминационная способность и достоверность прогностических возможностей факторов в определении вероятности наличия зооантропоноза, а также точка отсечения, чувствительность и специфичность для каждого фактора оценены с помощью ROC-анализа (Receiver Operating Characteristic). При проверке статистических гипотез наличие статистической значимости устанавливали при $p < 0,05$.

Результаты

Обследовано 111 здоровых добровольцев, у которых выявлены разные уровни антипаразитарных IgG при нормальном или повышенном уровне oIgE (табл. 1).

Уровень oIgE при наличии любого из исследуемых зооантропонозов значимо отличался от респондентов, не имеющих специфических IgG (рис. 1, табл. 2).

Таблица 1. Уровень специфических IgG при нормальном или повышенном уровне oIgE, n = 111

Table 1. Specific IgG level related to normal or elevated IgE levels, n = 111

Уровень IgG IgG level	oIgE (< 0,22) n = 47	oIgE (< 0,22) n = 47 min/max	oIgE (> 0,22) n = 64	oIgE (> 0,22) n = 64 min/max	p
Leptospira	0,072 [0,056–0,098]	0,036/0,251	0,119 [0,079–0,171]	0,020/0,800	0,0001
Listeria	0,109 [0,077–0,166]	0,032/0,295	0,143 [0,095–0,204]	0,051/0,435	0,079
Toxocara	0,099 [0,076–0,122]	0,030/0,201	0,121 [0,103–0,163]	0,048/0,324	0,0001
Toxoplasma	0,077 [0,057–0,095]	0,030/0,315	0,103 [0,080–0,147]	0,042/0,357	0,0001
Brucella	0,048 [0,041–0,058]	0,027/0,119	0,076 [0,058–0,102]	0,023/0,194	0,0001
Opisthorchis	0,059 [0,042–0,074]	0,022/0,136	0,096 [0,069–0,139]	0,043/0,229	0,0001
Возраст, лет Age	34 [24–47]		39 [26,3–50,8]		0,199

Примечание. Данные представлены в виде медианы [25–75-й перцентили] или абсолютных значений (проценты), p между группами рассчитано методом Манна–Уитни или χ^2 и точного критерия Фишера, в зависимости от типа данных.

Note. Data are presented as median [25th–75th percentiles] or absolute values (percentages), p between groups calculated by Mann–Whitney method or χ^2 and Fisher exact test, depending on data type.

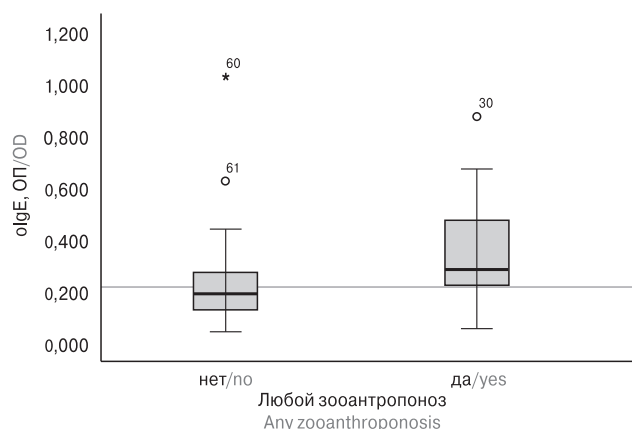


Рисунок 1. Уровень oIgE в зависимости от наличия любого из исследуемых зооантропонозов

Figure 1. oIgE level related to zooanthroponoses

Примечание. Жирная линия — медиана, боксы — 25–75 квартили, усы — 95% доверительный интервал, кружок и звездочка — выпадающие значения; серая линия — референсный уровень oIgE 0,220; статистически значимое отличие между группами $p = 0,0001$.

Note. Thick line — median, boxes — 25–75 quartiles, whiskers — 95% confidence interval, circle and asterisk — outliers; gray line — oIgE reference level 0.220; statistical differences between certificates $p = 0.0001$.

Из 47 обследованных с нормальным уровнем oIgE у 8 (17%) выявлены IgG к одному из исследуемых зооантропонозов, а из 64 обследованных с повышенным уровнем oIgE — IgG к одному или нескольким (2 и более) зооантропонозам выявлены у 31 (48%) человека (рис. 2).

Из 111 обследуемых у 39 (35%) человек выявлены специфические IgG к следующим зоонозам: *Leptospira*, *Listeria*, *Toxocara*, *Toxoplasma*, *Opisthorchis*. Из этих 39 обследуемых 11 человек (28%) имели антитела к двум и более зооантропонозам, что составило 10% от общей когорты обследуемых (111 человек). К *Brucella* диагностически значимого титра паразитарных антигенов в данной выборке не обнаружено (табл. 3).

Уровень oIgE прямо умеренно коррелирует с IgG к *Leptospira* ($p = 0,549$, $p = 0,0001$, $n = 12$); *Listeria* ($p = 0,283$, $p = 0,003$, $n = 20$); *Toxocara*

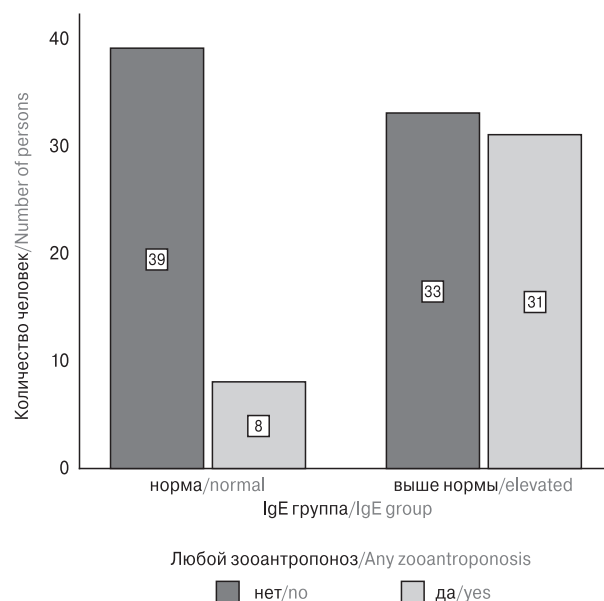


Рисунок 2. Распределение респондентов по уровню oIgE норма (< 0,22) и выше нормы (> 0,22) в зависимости от наличия любого из исследуемых зооантропонозов, $p = 0,001$

Figure 2. Normal (< 0.22) and elevated (> 0.22) oIgE level distribution of respondents related to zooanthroponoses, $p = 0.001$

($p = 0,388$, $p = 0,0001$, $n = 9$); *Toxoplasma* ($p = 0,387$, $p = 0,0001$, $n = 9$); любой из перечисленных инфекций ($p = 0,372$, $p = 0,0001$); несколькими инфекциям одновременно ($p = 0,378$, $p = 0,0001$).

Распределение специфических IgG среди респондентов с нормальным и повышенным oIgE представлено в табл. 4. У респондентов с повышенным oIgE специфические антитела встречались значимо чаще, чем при нормальном уровне oIgE. Два и более зооантропоноза выявлены только у респондентов с повышенным уровнем oIgE.

Характеристика респондентов разного возраста, в зависимости от oIgE выше нормы и анамнестических данных представлена в табл. 5. Значимых отличий у респондентов при повышенном уровне oIgE по показателям

Таблица 2. Уровень oIgE при наличии или отсутствии специфических IgG, $n = 111$

Table 2. oIgE level related to specific IgG antibodies, $n = 111$

	IgG (-), $n = 72$ (65%)	IgG (+), $n = 39$ (35%)	p
oIgE	0,194 [0,130–0,274]	0,342 [0,251–0,616]	0,0001
oIgE (> 0,22), n (%)	33 (46)	31 (79)	0,001
Возраст, лет Age	37 [25–49]	36 [28–51]	0,568

Примечание. Данные представлены в виде медианы [25–75-й процентиля] или абсолютных значений (проценты), p между группами рассчитано методом Манна–Уитни или χ^2 и точного критерия Фишера, в зависимости от типа данных.

Note. Data are presented as median [25th–75th percentiles] or absolute values (percentages), p between groups calculated by Mann–Whitney method or χ^2 and Fisher exact test, depending on data type.

Таблица 3. Количественное распределение по видам зоонозов среди лиц с положительным специфическим иммунным ответом, n = 39 (%)

Table 3. Zoonosis-specific quantitative distribution among individuals with positive specific immune response, n = 39 (%)

IgG	p	IgG +, n = 39 (35%)	
		один из зоонозов one of the zoonoses n = 28	2 и более зооноза у одного респондента 2 or more zoonoses per respondent n = 11
Leptospira	0,0001	5	7
Listeria	0,0001	13	7
Toxocara	0,0001	5	4
Toxoplasma	0,0001	3	6
Opisthorchis	0,014	2	2
Всего Total		28	26
		54 случая положительного специфического иммунного ответа у 39 человек 54 cases of positive specific immune response by 39 people	

Таблица 4. Распределение специфических IgG среди респондентов с нормальным или повышенным olgE, n = 111

Table 4. Specific IgG distribution among respondents with normal or elevated olgE, n = 111

	olgE (< 0,22) n = 47	olgE (> 0,22) n = 64	P, Хи-квадрат или критерий Фишера P, Chi-square or Fisher's test
Любой зооноз Any zoonosis, n (%)	8 (20,5)	31 (43)	0,001
Listeria, n (%)	4 (10)	16 (22)	0,027
Leptospira, n (%)	2 (5)	10 (14)	0,069
Toxocara, n (%)	1 (2,5)	8 (11)	0,076
Toxoplasma, n (%)	1 (2,5)	8 (11)	0,076
Opisthorchis, n (%)	0	4 (6)	0,136
2 и более зооноза 2 or more zoonoses, n (%)	0	11 (28)	0,005

Таблица 5. Характеристика респондентов разного возраста в зависимости от olgE выше нормы (> 0,22) и анамнестических данных, n = 111

Table 5. Age-related characteristics of respondents related to increased olgE level (> 0.22) and anamnestic data, n = 111

	Взрослые Adults n = 98 (%)	Дети (до 18 лет) Children (up to 18 years old) n = 13 (%)	P, Хи-квадрат или критерий Фишера P, Chi-square or Fisher's test
IgE (> 0,22), n (%)	47 (48)	5 (38)	0,568
Наличие домашних животных Pets	65 (66)	13 (100)	0,018
Употребление «урожа с грядки» Farm harvest	70 (71)	13 (100)	0,038

Таблица 6. Суставные боли при разном уровне olgE

Table 6. Joint pain related to olgE levels

	olgE (< 0,22) n = 47	olgE (> 0,22) n = 64	P, Хи-квадрат или критерий Фишера P, Chi-square or Fisher's test
Наличие суставных болей, n (%) Joint pain, n (%)	8 (20,5)	21 (29)	0,049

употребление речной рыбы, продуктов из свежей рыбы, регулярное употребление в пищу молочных продуктов домашнего происхождения, наличие домашнего скота в данной выборке найдено не было. Выявлены отличия по наличию домашних животных и употреблению «урожая с грядки».

Выявлена связь между наличием суставных болей с повышенным уровнем oIgE (табл. 6).

По результатам ROC-анализа выявлен предиктор наличия любого зооантропоноза по уровню oIgE: Площадь под кривой 0,73 [0,62–0,83], $p = 0,0001$; точка отсечения oIgE более 0,226 ОП, чувствительность 76%, специфичность 62% (рис. 3).

Уровень общего oIgE может быть предиктором наличия:

- токсоплазма — площадь под кривой 0,75 [0,58–0,92], $p = 0,021$; точка отсечения oIgE более 0,249, чувствительность 88%, специфичность 59%;
- лептоспироза — площадь под кривой 0,84 [0,70–0,97], $p = 0,0001$; точка отсечения oIgE более 0,284, чувствительность 91%, специфичность 74%;
- токсокароза — площадь под кривой 0,72 [0,53–0,92], $p = 0,026$; точка отсечения oIgE более 0,239, чувствительность 89%, специфичность 57%;
- описторхоза — площадь под кривой 0,88 [0,79–0,97], $p = 0,010$; точка отсечения oIgE более 0,307, чувствительность 100%, специфичность 76%;
- двух разных зооантропонозов — площадь под кривой 0,90 [0,80–0,99], $p = 0,0001$; точка отсечения oIgE более 0,249, чувствительность 100%, специфичность 61%.

Обсуждение

Со временем связь человека и животного изменилась. К примеру, роль домашних животных изменилась с рабочей (охрана жилища, ловля грызунов-вредителей) на социальную (общение). Домашние животные, являясь важным фактором физического и психического здоровья своих владельцев, также могут быть переносчиками зоонозных инфекций [27, 33]. Высокий риск передачи зоонозных инфекций от домашних животных человеку может возникнуть в случае наличия у животного привычки спать в постели хозяина, при облизывании животными лица или ран хозяина, при содержании экзотических животных в качестве домашних и при контакте с почвой [37]. Полученные в ходе нашего исследования данные согласуются и с данными ряда других авторов. Так, исследователи Cruz A.A., Cooper P.J., Figueiredo C.A. и соавт. в своей работе также

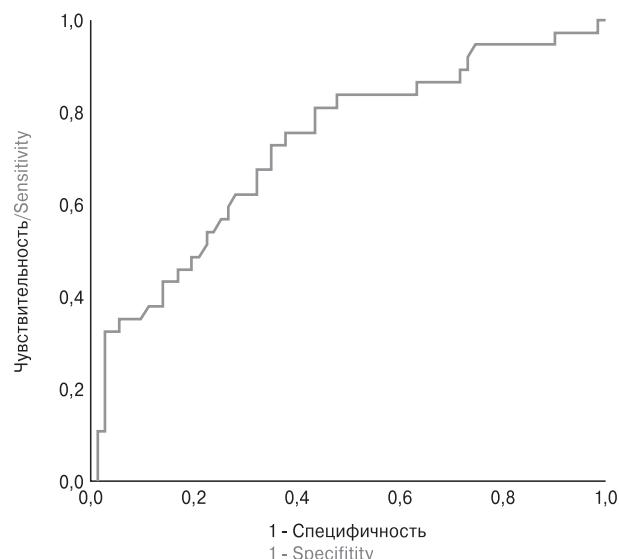


Рисунок 3. Предиктор наличия любого зооантропоноза — уровень oIgE более 0,226 ОП

Figure 3. oIgE level > 0.226 OD as a zoonanthropoноsis predictor

Примечание. Площадь под кривой 0,73 [0,62–0,83], $p = 0,0001$; чувствительность 76%, специфичность 62%.

Note. The area under curve 0.73 [0.62–0.83], $p = 0.0001$; sensitivity 76%, specificity 62%.

указывают на важность включения паразитарных аллергенов в первоначальную диагностику аллергических заболеваний [7].

Основным результатом данной работы является определение вероятности наличия любого зооантропоноза по повышенному уровню oIgE более 0,22 ОП.

Известно, что около 60% случаев пищевой аллергии у взрослых и детей сочетаются с респираторной аллергией [4, 34], симптомами которой являются кашель, одышка, затрудненное дыхание. Многочисленные научные исследования указывают на то, что в основе этих состояний лежит нарушение функционирования иммунной системы, которое определяется также образом жизни и окружающей средой, немаловажную роль в которых играют и паразитозы [3, 9, 23, 32]. По данным литературы, более 2 млрд человек во всем мире инфицированы кишечными паразитами, а 5 млрд проживают в районах с высоким риском заражения инвазивными возбудителями [25]. Некоторые паразиты являются геогельминтами, выделяя яйца, которые становятся заразными в почве [5, 8, 10, 14, 15, 18, 21, 24, 26, 28, 31].

Иммунные реакции, протекающие при ответе организма на паразитарную инвазию и аллергические заболевания, часто имеют сходную внешнюю симптоматику [1, 3, 11, 19, 32]. В многочисленных работах описаны аналогичные симптомы при обоих видах заболеваний.

Сходство обусловлено, прежде всего, активацией одних и тех же защитных механизмов при контакте с чужеродными белками [1, 3, 11, 19, 32]. Реакции и их тяжесть зависят от множества факторов. Сюда можно отнести гиперергические реакции, такие как синдром Леффлера или эозинофильная пневмония, требующие быстрой и таргетной терапии в виде системных кортикостероидов. Симптомы острого аллергического альвеолита напоминают симптомы острой респираторной инфекции. К ним относятся одышка, повышенная температура, озноб, недомогание, боли в суставах и кашель. Острая реакция на паразитов может быть аналогична острой аллергической реакции на ингаляционные или пищевые аллергены [3, 32]. Также в жизненном цикле некоторых паразитов участвуют личинки, которые ищут удобное место для развития в организме хозяина [10, 15, 28]. Миграция личинок сопровождается симптомами аллергии: папулезными, зудящими высыпаниями, крапивницей, реже конъюнктивитом, свистящим дыханием, одышкой, иногда кровохарканьем [3, 7, 10, 15, 29]. Таким образом, диагностика и диагноз имеют решающее значение.

Иммунный механизм аллергических и паразитарных заболеваний включает участие общего иммуноглобулина класса E (oIgE). oIgE индуцирует активацию тучных клеток с последующим высвобождением ряда провоспалительных цитокинов, запуская каскад патологических реакций и формируя локальное или системное воспаление [1, 3, 11, 12, 19, 20, 32].

На сегодняшний день в литературе недостаточно публикаций, где измерялись уровни oIgE в сыворотке и проводился анализ связи с системным воспалением, включая паразитарную инвазию, и его исходами, хотя становится все более очевидным, что иммуноглобулин E играет более широкую роль, охватывая многие заболевания.

Ограничениями данного исследования являются наблюдательный дизайн, отсутствие данных в динамике, а также небольшой объем выборки.

Таким образом, значимость зооантропонозов в общесоматической патологии в целом является актуальной нерешенной проблемой, особенно учитывая разнообразие и неспецифичность клинической картины паразитозов и аллергических проявлений, частого назначения антибактериальной терапии, стероидных гормонов для подавления аллергических реакций. Уровень oIgE может быть предиктором наличия зооантропоноза у условно здоровых лиц при уровне oIgE более 0,226 ОП.

Выявленные критерии диагностического скрининга зооантропонозов могут ускорить дифференциальную диагностику состояний, связанных с неспецифическими жалобами и возможными паразитозами. Крупные проспективные рандомизированные исследования помогут выявлению ранних диагностических критериев патологий при неспецифических жалобах, аллергическом анамнезе и наличии зоонозов.

Список литературы/References

1. Мачарадзе Д.Ш. Современные клинические аспекты оценки уровней общего и специфических IgE // Педиатрия. Журнал им. Г.М. Сперанского. 2017. Т. 96, № 2. С. 121–127. [Macharadze D.Sh. Modern clinical aspects of total and specific IgE evaluation. *Pediatr. Zhurnal im. G.M. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.M. Speransky*, 2017, vol. 96, no. 2, pp. 121–127. (In Russ.)] doi: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104
2. Юшук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Инфекционные болезни: национальное руководство. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 1104 с. (Серия «Национальные руководства») [Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. Infectious diseases: national guidelines. 3rd ed., revised. Moscow: GEOTAR-Media, 2023. 1104 p. (National Guidelines Series) (In Russ.)]
3. Bradding P., Walls A.F., Holgate S.T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, vol. 117, no. 6, pp. 1277–1284. doi: 10.1016/j.jaci.2006.02.039
4. Burbank A.J., Sood A.K., Kesic M.J., Peden D.B., Hernandez M.L. Environmental determinants of allergy and asthma in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, vol. 140, no. 1, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.010
5. Charlier C., Noel C., Hafner L., Moura A., Mathiaud C., Pitsch A., Meziane C., Jolly-Sanchez L., de Pontfarcy A., Diamantis S., Bracq-Dieye H., Disson O., Thouvenot P., Valès G., Tessaud-Rita N., Tourdjman M., Leclercq A., Lecuit M. Fatal neonatal listeriosis following *L. monocytogenes* horizontal transmission highlights neonatal susceptibility to orally acquired listeriosis. *Cell Rep. Med.*, 2023, vol. 4, no. 7: 101094. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101094
6. Criqui M.H., Lee E.R., Hamburger R.N., Klauber M.R., Coughlin S.S. IgE and cardiovascular disease. Results from a population-based study. *Am. J. Med.*, 1987, vol. 82, no. 5, pp. 964–968. doi: 10.1016/0002-9343(87)90159-8
7. Cruz A.A., Cooper P.J., Figueiredo C.A., Alcantara-Neves N.M., Rodrigues L.C., Barreto M.L. Global issues in allergy and immunology: parasitic infections and allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, vol. 140, no. 5, pp. 1217–1228. doi: 10.1016/j.jaci.2017.09.005
8. Parra Barrera E.L., Bello Piruccini S., Rodríguez K., Duarte C., Torres M., Undurraga E.A. Demographic and clinical risk factors associated with severity of lab-confirmed human leptospirosis in Colombia, 2015–2020. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2023, vol. 17, no. 7: e0011454. doi: 10.1371/journal.pntd.0011454
9. Feary J., Britton J., Leonardi-Bee J. Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 2011, vol. 66, no. 4, pp. 569–578. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02512.x

10. Song G., Yang C., Qu Z., Lin X., Liu M., Wang Y. Association between seropositivity for toxocarasis and cognitive functioning in older adults: an analysis of cross-sectional data from the US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2011–2014. *BMJ Open*, 2023, vol. 13, no. 3: e068974. doi: 10.1136/bmjopen-2022-068974
11. Grant A.V., Araujo M.I., Ponte E.V., Oliveira R.R., Cruz A.A., Barnes K.C., Beaty T.H. High heritability but uncertain mode of inheritance for total serum IgE level and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a schistosomiasis-endemic Brazilian population. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, no. 8, pp. 1227–1236. doi: 10.1086/591946
12. Gruber B.L. Immunoglobulin E, mast cells, endogenous antigens, and arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1991, vol. 17, no. 2, pp. 333–342.
13. Guo X., Yuan S., Liu Y., Zeng Y., Xie H., Liu Z., Zhang S., Fang Q., Wang J., Shen Z. Serum IgE levels are associated with coronary artery disease severity. *Atherosclerosis*, 2016, vol. 251, pp. 355–360. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.020
14. Charles J.C., Jayarajah U., Subasinghe D. Clinical characteristics and outcomes of patients with leptospirosis complicated with acute pancreatitis: a systematic review. *J. Int. Med. Res.*, 2023, vol. 51, no. 9: 3000605231197461. doi: 10.1177/03000605231197461
15. Ulloque-Badaracco J.R., Hernandez-Bustamante E.A., Alarcón-Braga E.A., Huayta-Cortez M., Carballo-Tello X.L., Seminario-Amez R.A., Rodríguez-Torres A., Casas-Patiño D., Herrera-Añazco P., Benites-Zapata V.A. Seroprevalence of human toxocarasis in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *Front. Public Health.*, 2023, no. 11: 1181230. doi: 10.3389/fpubh.2023.1181230
16. Korkmaz M.E., Oto A., Saraçlar Y., Oram E., Oram A., Ugurlu S., Karamehmetoglu A., Karaagaoglu E. Levels of IgE in the serum of patients with coronary arterial disease. *Int. J. Cardiol.*, 1991, vol. 31, no. 2, pp. 199–204. doi: 10.1016/0167-5273(91)90216-c
17. Kounis N.G., Hahalis G. Serum IgE levels in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2016, vol. 251, pp. 498–500. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.045
18. Suominen K., Jaakola S., Salmenlinna S., Simola M., Wallgren S., Hakkinen M., Suokorpi A., Rimhanen-Finne R. Invasive listeriosis in Finland: surveillance and cluster investigations, 2011–2021. *Epidemiol. Infect.*, 2023, vol. 151: e118. doi: 10.1017/S0950268823001073
19. Kyoizuka H., Murata T., Fukuda T., Endo Y., Yamaguchi A., Yasuda S., Kanno A., Sato A., Ogata Y., Hosoya M., Yasumura S., Hashimoto K., Nishigori H., Fujimori K.; Japan Environment and Children's Study (JECS) Group. Immunoglobulin E levels and pregnancy-induced hypertension: Japan Environment and Children's Study. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 8664. doi: 10.1038/s41598-021-88227-2
20. MacGlashan D.Jr., Lavens-Phillips S., Katsushi M. IgE-mediated desensitization in human basophils and mast cells. *Front. Biosci.*, 1998, vol. 3: d746-56. doi: 10.2741/a318
21. Macpherson C.N. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 2005, vol. 35, no. 11–12, pp. 1319–1331. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.06.004
22. Magnaval J.F., Fillaux J., Cassaing S., Valentin A., Iriart X., Berry A. Human toxocarasis and atopy. *Parasite*, 2020, no. 27: 32. doi: 10.1051/parasite/2020029
23. Maizels R.M., McSorley H.J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, vol. 138, no. 3, pp. 666–675. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.007
24. Durieux M.F., Lopez J.G., Banjari M., Passebosc-Faure K., Brenier-Pinchart M.P., Paris L., Gargala G., Berthier S., Bonhomme J., Chemla C., Villena I., Flori P., Fréalle E., L'Ollivier C., Lussac-Sorton F., Montoya J.G., Cateau E., Pomares C., Simon L., Quinio D., Robert-Gangneux F., Yera H., Labriffe M., Fauchais A.L., Dardé M.L. Toxoplasmosis in patients with an autoimmune disease and immunosuppressive agents: a multicenter study and literature review. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 2022, vol. 16, no. 8: e0010691. doi: 10.1371/journal.pntd.0010691
25. Medeiros M Jr, Figueiredo J.P., Almeida M.C., Matos M.A., Araújo M.I., Cruz A.A., Atta A.M., Rego M.A., de Jesus A.R., Taketomi E.A., Carvalho E.M. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, vol. 111, no. 5, pp. 947–951. doi: 10.1067/mai.2003.1381
26. Gupta N., Wilson W., Ravindra P. Leptospirosis in India: a systematic review and meta-analysis of clinical profile, treatment and outcomes. *Infez. Med.*, 2023, vol. 31, no. 3, pp. 290–305. doi: 10.53854/liim-3103-4
27. Overgaauw P.A.M., Vinke C.M., Hagen M.A.E.V., Lipman L.J.A. A One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, vol. 17, no. 11: 3789. doi: 10.3390/ijerph17113789
28. Pezeshkian F., Pouryousef A., Omidian M., Mikaeili F., Safarpour A.R., Shojaei-Zarghani S., Sarkari B. Seroprevalence of toxocarasis and its associated risk factors among adult population in Kavar District, Fars Province, South of Iran: a cross-sectional community-based seroepidemiological survey. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2023, no. 2023: 2721202. doi: 10.1155/2023/2721202
29. Robertson I.D., Thompson R.C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes Infect.*, 2002, vol. 4, no. 8, pp. 867–873. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01607-6
30. Sinkiewicz W., Błazejewski J., Bujak R., Kubica J., Dudziak J. Immunoglobulin E in patients with ischemic heart disease. *Cardiol J.*, 2008, vol. 15, no. 2, pp. 122–128.
31. Strand T.M., Olsson Engvall E., Lahti E., Hjertqvist M., Lundkvist Å. *Leptospira* status in Sweden during the past century, neglected and re-emerging? *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 8: 1991. doi: 10.3390/microorganisms11081991
32. Theoharides T.C., Kalogeromitos D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2006, vol. 1088, pp. 78–99. doi: 10.1196/annals.1366.025
33. Thompson A., Kutz S. Introduction to the Special Issue on 'Emerging Zoonoses and Wildlife'. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, 2019, no. 9: 322. doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.07.002
34. Von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, vol. 137, no. 3, pp. 680–689. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1301
35. Wang Z., Shen X.H., Feng W.M., Qiu W. Mast cell specific immunological biomarkers and metabolic syndrome among middle-aged and older Chinese adults. *Endocr. J.*, 2017, vol. 64, no. 3, pp. 245–253. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0388

36. Wells D.L. The effects of animals on human health and well-being. *Journal of Social Issues*, 2009, vol. 65, no. 3, pp. 523–543. doi: 10.1111/j.1540-4560.2009.01612.x
37. World Health Organization Asia Pacific Strategy for Emerging Diseases: 2010. [Accessed on 20 July 2020]; Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific. URL: https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/7819/9789290615040_eng.pdf
38. Xiong F., Tong Y., Li P., Huo T., Mao M. Serum immunoglobulin E level and its impact on the pregnancy outcome associated with fetal growth restriction: a prospective cohort study. *Genet. Mol. Res.*, 2015, vol. 14, no. 2, pp. 3879–3888. doi: 10.4238/2015.April.27.2

Авторы:

Замятина Е.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории инвазивных медицинских технологий ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия; врач-инфекционист, врач-пульмонолог ООО «Центр персонализированной медицины», г. Новосибирск, Россия;

Шевела А.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, зам. директора ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия; директор по науке ООО «Центр персонализированной медицины», г. Новосибирск, Россия;

Мандель И.А., к.м.н., доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия; доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, Москва, Россия;

Сизов А.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории оптимизации противозооэпизоотических систем ФГУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии РАН, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск Россия;

Степанов А.А., к.м.н., доцент, зав. лабораторией геномных медицинских технологий ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия; зав. клинической лабораторией ООО «Центр персонализированной медицины», г. Новосибирск, Россия;

Сизов Д.А., научный сотрудник лаборатории оптимизации противозооэпизоотических систем ФГУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии РАН, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск Россия;

Даниленко С.О., ассистент кафедры фундаментальной медицины Института медицины и психологии В. Зельмана ФГАУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Zamyatina E.V., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Invasive Medical Technology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; Infectiologist, Pulmonologist, Center of New Medical Technologies, Novosibirsk, Russian Federation;

Shevela A.I., DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, Deputy Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; Scientific Director, Center of New Medical Technologies, Novosibirsk, Russian Federation;

Mandel I.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Anaesthesiology and Resuscitation Science, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Anaesthesiology and Resuscitation Science, Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Sizov A.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Optimisation of Anti-Epizootic Systems, Siberian Federal Research Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk, Russian Federation;

Stepanov A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Genomic Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; Head of the Clinical Laboratory, Center of New Medical Technologies, Novosibirsk, Russian Federation;

Sizov D.A., Researcher, Laboratory for Optimisation of Anti-Epizootic Systems, Siberian Federal Research Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk, Russian Federation;

Danilenko S.O., Assistant Professor, Department of Fundamental Medicine, V. Zelman Institute for Medicine and Psychology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

СТРУКТУРИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В РЕГИОНАХ С НИЗКОЙ И ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТЬЮ НАСЕЛЕНИЯ

З.М. Загдын¹, А.Б. Зудин¹, Н.В. Кобесов², Т.П. Васильева¹, А.С. Галоян¹, Е.В. Вербицкая³

¹ ФГБНУ Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия

² ГБУЗ РСО-Алания Республиканский клинический центр фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения РСО-Алания, г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

³ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В России на фоне повышения уровня жизни населения и улучшения эпидемической ситуации ведущими становятся социально-демографические, медико-организационные, климатические и экологические факторы риска распространения туберкулеза (ТБ), такие как плотность населения, интенсивность социальных контактов, доступность медицинской помощи, сезонные изменения климата, проблемы экологии, которые влияют на качество общественного здоровья. Между тем выраженность тех или иных факторов риска заболевания ТБ в регионах России в зависимости от плотности населения не изучалась. Целью исследования являлось изучение структурированных факторов риска распространения ТБ в регионах с высокой и низкой плотностью населения, снижающих качество общественного здоровья. *Материалы и методы.* По методу исследование социологическое, кластерно-квотное, с выборкой, формируемой респондентами, и очным раздаточным анкетированием 2500 человек, из которых 1497 были из Республики Северная Осетия — Алания (РСО-Алания) с высокой плотностью населения, 1003 — из Республики Карелия с низкой плотностью населения. Достоверность различий оценивалась значением точного критерия Фишера с использованием таблицы сопряженности. *Результаты.* В Республике Карелия, по сравнению с РСО-Алания, несмотря на более высокий валовой региональный продукт (527,8 тыс. руб. против 293,4 тыс. руб., $p < 0,000$), социальные и поведенческие факторы риска заболевания ТБ были достоверно выше: меньше респондентов с высшим образованием (18,4% против 33,6%, $p < 0,000$), больше разведенных (18,7% против 26,9%, $p < 0,022$), больше проживающих в многоквартирных домах (65,0% против 39,5%, $p < 0,000$), больше работающих по найму, выполняющих сезонные работы, безработных, пенсионеров по возрасту и инвалидности (55,0% против 32,3%, $p < 0,000$), больше употребляющих алкоголь (67,4% против 34,3%, $p < 0,000$), «тяжелых» курильщиков (20,8% против 7,2%, $p < 0,000$), больше имеющих хронические заболевания (43,7% против 32,1%, $p < 0,02$); больше проблем, связанных с доступностью к медицинской помощи: менее доступны муниципальные поликлиники (42,7% против 85,6%, $p < 0,000$), чаще отмечаются удаленное расположение медицинских организаций (21,4% против 2,7%, $p < 0,000$), отсутствие транспортного сообщения (15,7% против 8,5%, $p < 0,000$), плохие дороги (5,9% против 16,9%, $p < 0,000$) и недостаток врачей-специалистов (60,9% против 16,8%, $p < 0,000$). В РСО-Алания

Адрес для переписки:

Загдын Зинаида Моисеевна
105064, Россия, Москва, ул. Воронцово поле, 12, стр. 1,
ФГБНУ Национальный НИИ общественного здоровья
имени Н.А. Семашко.
Тел.: 8 921 767-69-47.
E-mail: dinmetyan@mail.ru

Contacts:

Zinaida M. Zagdyn
105064, Russian Federation, Moscow, Vorontsovo Pole str., 12,
build. 1, N.A. Semashko National Research Institute of Public Health.
Phone: +7 921 767-69-47.
E-mail: dinmetyan@mail.ru

Для цитирования:

Загдын З.М., Зудин А.Б., Кобесов Н.В., Васильева Т.П., Галоян А.С.,
Вербицкая Е.В. Структурированные факторы риска распространения
туберкулеза в регионах с низкой и высокой плотностью населения //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 981–994. doi: 10.15789/2220-
7619-STR-17030

Citation:

Zagdyn Z.M., Zudin A.B., Kobesov N.V., Vasileva T.P., Galoyan A.S.,
Verbitskaya E.V. Structured TB risk factors in regions with low and high
population density // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 981–994. doi: 10.15789/2220-7619-
STR-17030

респонденты чаще имели социальные контакты с больными ТБ, чем в Республике Карелия (66,9% против 34,8%, $p < 0,000$). *Заключение.* Определяющими в распространении ТБ в регионах с высокой плотностью населения являются эпидемиологические факторы риска; в регионах с низкой плотностью населения сохраняется актуальность социальных, поведенческих факторов и доступность оказания медицинской помощи, что необходимо учитывать при разработке мер по эффективному управлению эпидемическим процессом.

Ключевые слова: туберкулез, факторы риска, плотность населения, доступность медицинской помощи, общественное здоровье, здравоохранение.

STRUCTURED TB RISK FACTORS IN REGIONS WITH LOW AND HIGH POPULATION DENSITY

Zagdyn Z.M.^a, Zudin A.B.^a, Kobesov N.V.^b, Vasileva T.P.^a, Galoyan A.S.^a, Verbitskaya E.V.^c

^a N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation

^b Republic Clinical Center of Phthisiopulmonology of Ministry of Health of the Republic of North Ossetia — Alania, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

^c I. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In Russia, socio-demographic, health care management, climatic and environmental TB risk factors such as population density, intensity of social contacts, availability of medical care, seasonal climate changes, environmental issues affecting quality of public health have been holding the leading place while a life standard elevates, and epidemic situation becomes improved. However, the magnitude of specific population density-related TB risk factors in the Russian regions has not been examined yet. The study aim was to assess structured TB risk factors in the Russian regions with high and low population densities decreasing public health quality. *Materials and methods.* There was conducted a study using sociological, cluster-quota approaches, with respondent-based sample and a face-to-face distribution questionnaire provided by 2500 subjects, of which 1497 were from the North Ossetia-Alania Republic with a high population density, 1003 — from the Republic of Karelia with a low population density. A significance of differences was assessed by using exact criterion Fisher using a contingency table. *Results.* In the Republic of Karelia, compared with North Ossetia-Alania Republic, despite a higher gross regional product (527.8 thousand rubles vs 293.4 thousand rubles, $p < 0.000$), social and behavioral TB risk factors were significantly elevated: fewer respondents with high education (18.4% vs 33.6%, $p < 0.000$), higher divorced (18.7% vs 26.9%, $p < 0.022$), higher number of those living in apartment buildings (65.0% vs 39.5%, $p < 0.000$), more hired and seasonal workers, unemployed, pensioners due to age and disability (55.0% vs 32.3%, $p < 0.000$), more alcohol abusers (67.4% vs 34.3%, $p < 0.000$), “heavy” smokers (20.8% vs 7.2%, $p < 0.000$), more subjects with chronic diseases (43.7% vs 32.1%, $p < 0.02$); more issues related to accessibility to medical care: municipal polyclinics are less available (42.7% vs 85.6%, $p < 0.000$), the distant location of medical facilities (21.4% vs 2.7%, $p < 0.000$), lack of transport links (15.7% vs 8.5%, $p < 0.000$), poor roads (5.9% vs 16.9%, $p < 0.000$) and few medical specialists (60.9% vs 16.8%, $p < 0.000$) are more often noted. In the North Ossetia-Alania Republic vs the Republic of Karelia, respondents had more frequent social contact with TB patients (66.9% vs 34.8%, $p < 0.000$). *Conclusion.* The epidemiological TB factors in the Russian regions with high population density hold a lead place; in regions with low population density, social, behavioral and accessibility to medical care factors remain relevant, which should be taken into account while developing measures for efficient management of epidemic process.

Key words: tuberculosis, risk factors, population density, medical care access, public health, health care.

Введение

Исходя из главного принципа системы здравоохранения о единстве профилактики и лечения болезни, основоположником которой является Н.А. Семашко, при разработке системы противодействия распространению определенного заболевания необходимо учитывать его социальную значимость для общественного здоровья (ОЗ) [2, 23, 24]. Актуальность изучения распространения туберкулеза (ТБ) как социально значимой инфекции для ОЗ не подвергается сомнению: согласно глобальному отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2021 г. в мире было выявлено 10,6 млн новых случаев ТБ, из которых 450 000 имели множественную лекарственную устойчи-

вость (МЛУ) возбудителя, 703 000 — сочетание с ВИЧ-инфекцией; также зарегистрировано 1,6 млн случаев смерти от ТБ [31].

В России борьба с ТБ исторически велась на уровне государства [12, 38]. Такая стратегия сохраняется и на современном этапе: согласно Постановлению Правительства Российской Федерации (РФ) от 2004 г., ТБ в стране классифицируется как социально значимое и представляющее опасность для окружающих инфекционное заболевание [18]. В последнее десятилетие, несмотря на значительные достижения в противодействии распространению ТБ, которые были отмечены ВОЗ выводом России из списка стран с высоким глобальным бременем заболевания в 2021 г., в РФ, как и в большинстве стран мира, наблюдается рост случаев

ТБ с МЛУ возбудителя и его сочетания с ВИЧ-инфекцией [5, 17, 31]. Уровень распространения ТБ в субъектах РФ неравномерный, что зависит от социально экономических, демографических, климатогеографических и прочих особенностей регионов [13]. Эти региональные особенности, являющиеся ключевыми факторами риска распространения ТБ, должны изучаться с последующей разработкой нормативно-правовых актов (НПА), направленных на эффективное управление эпидемическим процессом.

Основные факторы риска заболевания ТБ как в отечественной, так зарубежной литературе представлены широко. ВОЗ определяет пять ведущих причин заболевания ТБ населения мира: плохое питание (недоедание), ВИЧ-инфекция, сахарный диабет (СД), табакокурение и употребление алкоголя, приносящее вред здоровью [31]. Выделяются социально-демографические факторы риска: ТБ чаще заболевают мужчины трудоспособного возраста, кроме того, с мужским полом чаще ассоциируются неблагоприятные исходы заболевания [16, 30]. Также исследователи связывают риск заболевания ТБ с уровнем образования: ТБ чаще подвержены лица с низким уровнем образования [19]. Поведенческие факторы риска формируют табакокурение, которое в странах низкого и среднего экономического развития имеет строгую ассоциацию с развитием активного ТБ; употребление алкоголя, наркотических веществ [34]. Наличие проблем с правовыми органами (пребывание в местах лишения свободы (МЛС), бездомность, бедность, миграционные процессы, в том числе трудовая миграция, беженцы составляют основу социально-экономических факторов риска ТБ, особенно с МЛУ возбудителя [3, 4, 8, 32]. Заболевания, приводящие к снижению иммунной реакции организма, также способствуют развитию ТБ: ВИЧ-инфекция, СД, хронические заболевания дыхательной, желудочно-кишечной систем, пылевые заболевания легких, болезни, связанные с приемом кортикостероидов, лучевой терапией и пр. [1, 14, 26, 27, 29, 36]. Наиболее важным в распространении ТБ является эпидемиологический фактор: контакт с больным активным туберкулезным процессом, где риск развития заболевания зависит от частоты и длительности такого контакта и наличия перечисленных выше факторов риска [21, 25]. Во фтизиатрии особо выделяют группу профессиональных тубконтактов, риск заболевания которых преимущественно зависит от санитарно-эпидемиологических мер, реализуемых в медицинской организации (МО) [9, 20]. Между тем в научной литературе исследования, связанные с изучением факторов риска распространения ТБ на территориях с различной плотностью насе-

ления, весьма ограничены. Мы нашли лишь одну зарубежную публикацию, косвенно отражающую связь риска заболевания ТБ жителей от плотности заселения и высоты жилых зданий в Гонконге [33]. В отечественной литературе подобные публикации вовсе отсутствуют. На современном этапе на фоне повышения уровня жизни населения России распространение ТБ все больше обуславливается социально-демографическими, климатическими и экологическими особенностями, такими как плотность населения, сезонные колебания температуры, вредные выбросы в атмосферу.

В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение структурированных факторов риска распространения ТБ в регионах с различной (высокой и низкой) плотностью населения, снижающих качество общественного здоровья, отрицательно влияя на здоровьесбережение.

Материалы и методы

По методу проведения исследование — социологическое, по виду — аналитическое с организацией индивидуализированного, очного (раздаточного) анкетного опроса жителей пилотных субъектов РФ. По методу отбора анкетированных из генеральной совокупности (выборке) поперечное исследование было многоступенчатым кластерным с малыми (гнездными) группами и квотным: на первом этапе отбирались районы регионов в соответствии с требованиями минимальных различий между ними и максимальной неоднородности составляющих их единиц [10, 22]. В рамках самих гнезд отбор респондентов осуществлялся по методу многоступенчатой квотной выборки, репрезентативной по отношению к социально-демографической структуре населения выбранных районов. Квотными признаками были: пол, возраст, место проживания (город, село). Опрос анкетированных проводился путем выборки по удобству, формируемой респондентами, и анонимно, без предоставления идентификационных данных респондентов [11, 15]. Перед анкетированием обученным специалистом проводилось устное информирование респондентов о целях, задачах, форме исследования.

Сбор информации проводился в двух регионах России: Республике Северная Осетия — Алания (РСО-Алания, РСО-А) с высокой плотностью населения и Республике Карелия (РК) — арктическом регионе, имеющим низкую плотность населения.

Анкета включала 41 вопрос, 5 из которых были открытыми: без заданных ответов на вопрос (рис. 1). Вопросы состояли из 8 блоков, и ответы на них предоставляли следующие сведения: по-

ловозрастные; социально-экономические и поведенческие; эпидемиологические и медико-социальные; культурно-исторические; экологические; о доступности медицинской помощи; о доступности интернета, мобильной связи, телемедицины и других видов цифровых технологий, используемых в здравоохранении; об уровне знаний по профилактике ТБ.

В настоящей статье представлены результаты анализа части проведенного исследования, а именно: социально-демографические (пол, возраст), социально-экономические и поведенческие (уровень образования, место жительства (город, село), условия проживания, семейное положение, наличие работы, вид трудовой деятельности, уровень зарплаты, употребление алкоголя, табакокурение, отношения с правовыми органами); медико-социальные (наличие хронических заболеваний, оценка собственного здоровья, причины плохого здоровья) и медико-организационные (доступность медицинской помощи: виды и отдаленность МО, транспортное сообщение, наличие врачей-спе-

циалистов и пр.), а также эпидемиологические факторы риска заболевания ТБ (контакты с близкими, дальними родственниками, соседями, коллегами, имеющими ТБ).

Размер выборки в исследовании в РСО-Алания при погрешности $\pm 3,0\%$, 95,0% доверительном интервале и генеральной совокупности $\sim 700\,000$ человек, а в РК — 620 000 человек, составил (с учетом исключения $\sim 150\text{--}200$ анкет с неполными ответами) 1497 и 1003 респондента соответственно, с сохранением квотных соотношений анкетированных по полу, возрасту и месту проживания по отношению к генеральной совокупности. В РСО-Алания в исследование были включены все 9 административных образований (АО), в том числе г. Владикавказ, в РК — все 6 арктические АО и кластерно — 6 неарктические районы (рис. 2).

В число респондентов были включены пациенты с активным туберкулезным процессом, лица, имеющие клиническое излечение заболевания, и тубконтакты, состоящие на диспансерном учете в противотуберкулезных МО.

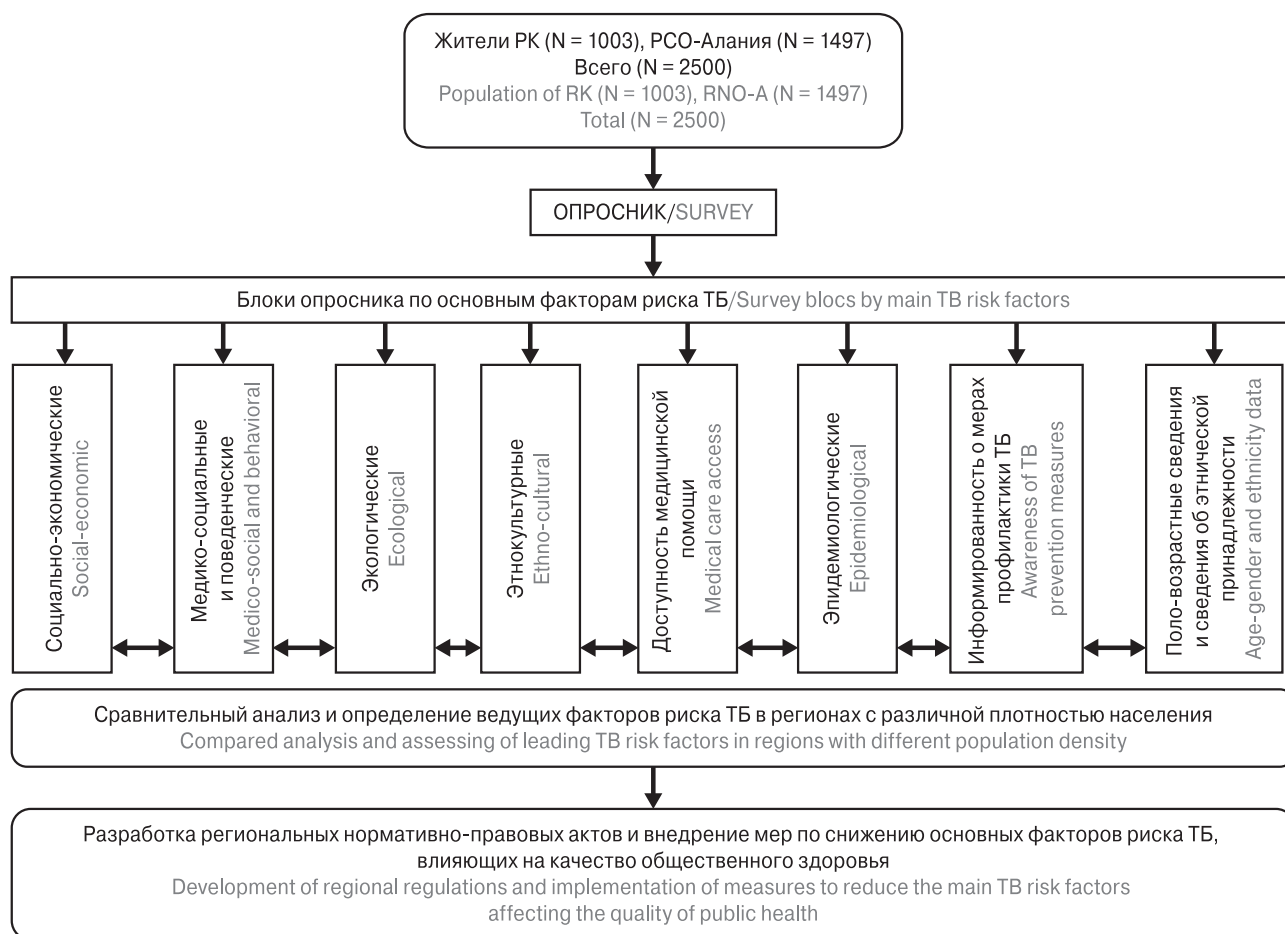


Рисунок 1. Схема (дизайн) исследования

Figure 1. The study scheme (design)

Примечание. РК — Республика Карелия, РСО-Алания — Республика Северная Осетия – Алания, ТБ — туберкулез.
Note. RK — Republic of Karelia, RNO — Republic of North Ossetia – Alania, TB — tuberculosis.

Опрос пациентов с активным ТБ проводился с целью сравнения выраженности факторов риска с респондентами без ТБ; результаты такого анализа будут представлены в отдельном исследовании, над которым авторы работают в настоящее время.

Период исследования составил 9 месяцев: с января по сентябрь 2023 г., исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко от 14.01. 2023 г. Математическая обработка результатов исследования выполнена на базе платформы SPSS.26; различия сравниваемых переменных оценивались по точному критерию Фишера с использованием таблицы сопряженности и определением значения вероятности p .

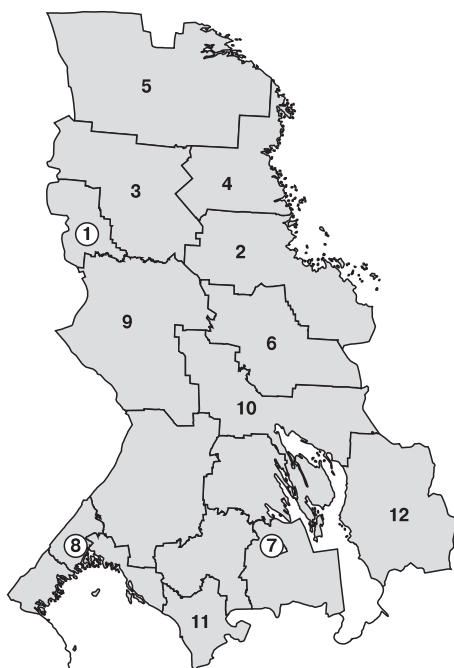
Основной гипотезой исследования было предположение о способствовании высокой плотности населения распространению ТБ не-

зависимо от выраженности социально-экономических факторов, где главным становится эпидемиологический риск; в регионах с низкой плотностью населения (арктические) ведущими факторами риска заболевания ТБ являются социально-экономические, медико-социальные, медико-организационные и поведенческие.

Результаты

В таблице представлена сравнительная характеристика общих данных РК и РСО-Алания.

Площадь территории РК в 22 раза превышает таковую РСО-Алания ($p < 0,000$), а плотность населения РК, наоборот, в 29 раз ниже плотности населения РСО-Алания ($p < 0,000$). Количество населения и соотношения по полу не имеют достоверных различий между регионами ($p > 0,05$). Городские жители преобладают над сельскими в том и другом регионе;



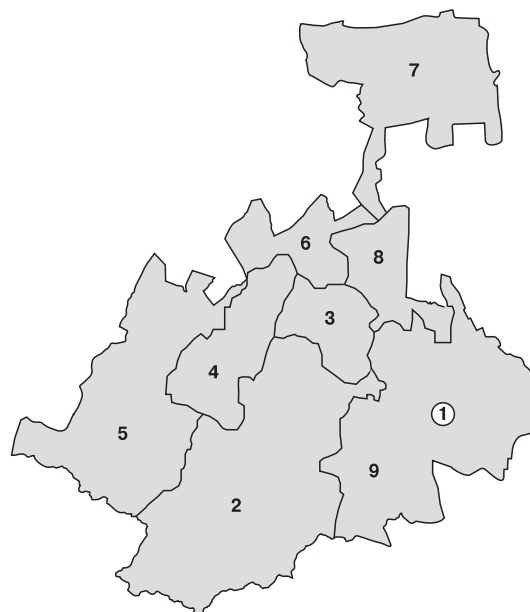
Республика Карелия/Republic of Karelia

6 арктических территорий/6 arctic territories

- 1 — г. Костомукша/Kostomuksha
- 2 — Беломорский район/Belomorskiy district
- 3 — Калевальский район/Kalevalsky district
- 4 — Кемский район/Kemsky district
- 5 — Лоухский район/Loukhsky district
- 6 — Сегежский район/Segezha district

6 неарктических территорий/6 nonarctic territories

- 7 — г. Петрозаводск/Petrozavodsk
- 8 — г. Сортавала/Sortavala
- 9 — Муезерский район/Muezerskiy district
- 10 — Медвежьегорский район/Medvezhegorskiy district
- 11 — Олонецкий район/Olonetskiy district
- 12 — Пудожский район/Pudozhski district



Республика Северная Осетия – Алания

Republic of North Ossetia – Alania

9 административных территорий

- 1 — г. Владикавказ/Vladikavkaz
- 2 — Алагирский район/Alagirskiy district
- 3 — Ардонский район/Ardonskiy district
- 4 — Дигорский район/Digorskiy district
- 5 — Ирафский район/Irafskiy district
- 6 — Кировский район/Kirovskiy district
- 7 — Моздокский район/Mozdokskiy district
- 8 — Правобережный район/Pravoberezhniy district
- 9 — Пригородный район/Prigorodniy district

Рисунок 2. Территории Республики Карелия и Республики Северная Осетия-Алания, вошедшие в исследование

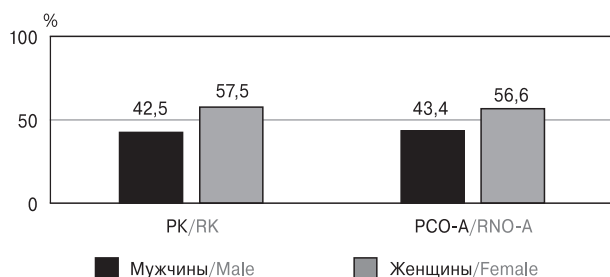
Figure 2. Territories of the Republic of Karelia and the Republic of North Ossetia-Alania included in the study

Таблица. Общая характеристика Республики Карелия и Республики Северная Осетия – Алания (Росстат, 2022 г., ф. 8., 2023 г.)

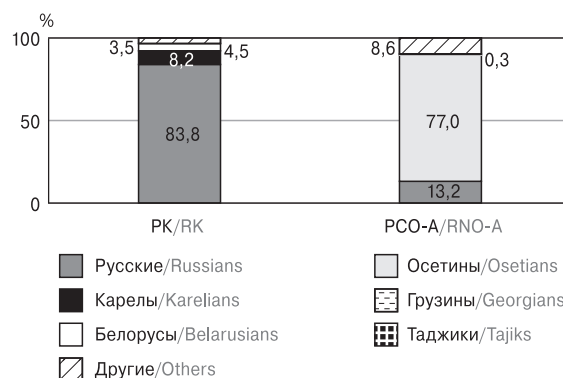
Table. General characteristics of the Republic of Karelia and the North Ossetia-Alania Republic (Rosstat, 2022, form no. 8, 2023)

Характеристика Characteristic	РК RK	РСО-Алания RNO-Alania	р
Общая площадь территории (км ²)/Total area (km ²)	180 520	8000	< 0,000
Население всего (а.ч.)/Population totally (a.n.)	527 880	683 071	< 0,04
Плотность населения (чел/км ²)/Population density (ppl/km ²)	2,92	85,23	< 0,000
Мужчины (%) /Male (%)	43,5	44,8	> 0,5
Женщины (%) /Female (%)	56,2	55,2	> 0,5
Городские жители (%) /Urban population (%)	79,7	63,2	< 0,021
Сельские жители (%) /Rural population (%)	20,3	36,8	< 0,034
Валовой региональный продукт (ВРП) на душу населения (руб., 2021 г.) Gross regional product (GRP) per capita (rub., 2021)	527,8 тыс.	293,4 тыс.	< 0,000
Заболееваемость ТБ (на 100 000 нас., 2022 г.) TB incidence (per 100 000 pop., 2022)	21,7	31,5	< 0,000

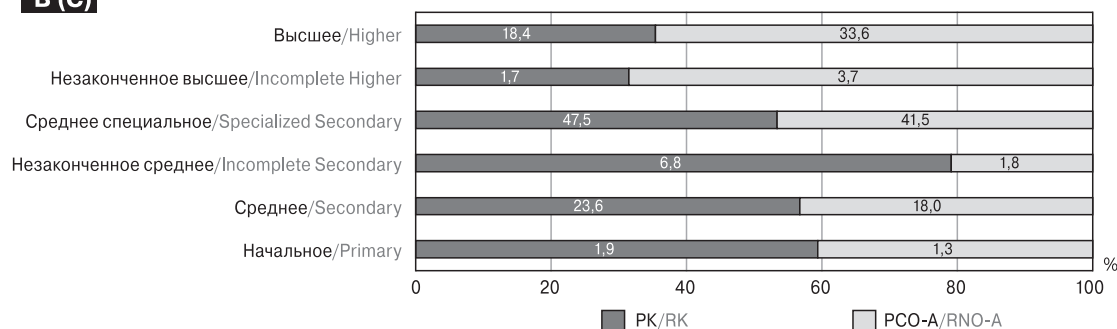
А (А)



Б (В)



В (С)



Г (D)

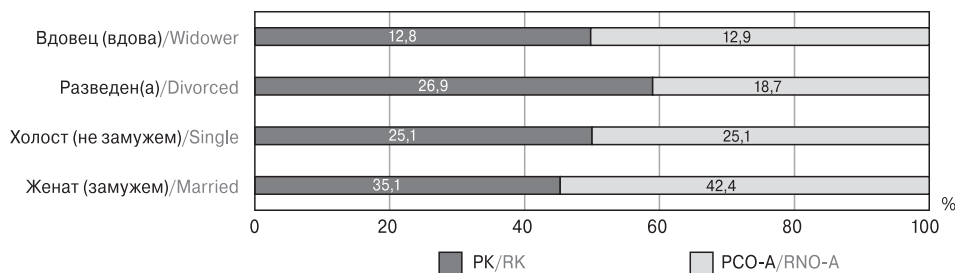


Рисунок 3. Социально-демографические факторы риска: 3А – различия по полу, 3Б – этническая принадлежность, 3В – уровень образования, 3Г – семейное положение

Figure 3. Socio-demographic risk factors: 3A – gender differences, 3B – ethnicity, 3C – level of education, 3D – marital status

в РСО-Алания горожан значительно меньше, чем в РК (63,2% против 79,7%, $p < 0,021$), а сельских жителей достоверно больше, чем в РК (36,8% против 20,3%, $p < 0,034$). Обращает внимание на существенное превышение валового регионального продукта (ВРП) на душу населения за 2021 год в РК (527,8 тыс. руб.) над аналогичной характеристикой РСО-Алания (293,4 тыс. руб., $p < 0,000$), кроме того, заболеваемость ТБ за 2022 год в РК была достоверно ниже таковой в РСО-Алания (21,7 против 31,5 на 100 тыс. нас., $p < 0,000$).

По результатам самого социологического исследования средний возраст респондентов не имел достоверных различий, составил $48,27 \pm 16,9$ и $47,26 \pm 14,3$ в РК и РСО-Алания соответственно ($p > 0,11$). В соответствии с квотными характеристиками как в РК (57,5%), так и в РСО-Алания (56,6%) среди респондентов преобладали женщины без существенных различий их доли между регионами (рис. 3А).

Этнически в РК преобладало русскоязычное население (83,8%), в РСО-Алания — осетины (77,0%, $p < 0,000$); другие национальности составили от 8,2% карелов в РК до 0,3% таджиков в РСО-Алания (рис. 3Б). По уровню образования в том и другом регионе большинство (более 40,0%) составили лица со среднеспециальным образованием (рис. 3В). Тем не менее в РСО-Алания респонденты достоверно чаще, чем в РК, имели высшее образование (33,6% против 18,4%, $p < 0,000$), соответственно в РК было больше лиц с начальным, средним, и незаконченным средним образованием, нежели в РСО-Алания (32,3% против 21,1%). Доля лиц с незаконченным высшим образованием в регионах была незначительной: 1,7% в РК, 3,7% в РСО-Алания. По семейному положению больше было женатых (замужних) респондентов как в РК (35,1%), так и в РСО-Алания (42,4%), однако в РК доля разведенных достоверно преобладала над таковой в РСО-Алания (26,9% против 18,7%, $p < 0,022$) (рис. 3Г). В целом доля одиноких респондентов, за исключением разведенных, в обоих регионах была почти равнозначной, составив в РК 37,9%, в РСО-Алания — 38,0%.

Как в РК, так и в РСО-Алания преобладали городские жители, составившие соответственно 77,2% и 68,7% (рис. 4А). В РСО-Алания жители чаще проживали в частных (60,2%), а в РК — чаще в многоквартирных домах (39,5%, $p < 0,000$). Кроме того, в РСО-Алания доля имеющих жилье площадью от 51 м² и больше была в два раза выше, чем в РК (68,3% против 34,5%, $p < 0,000$).

В исследуемых регионах более 90,0% респондентов имели работу, которые преимущественно трудились в госучреждениях: в РК — 75,3%, в РСО-Алания 87,0% (рис. 4Б).

Индивидуальным предпринимательством занималась незначительная часть анкетированных, преимущественно в РК (7,2%), а в РСО-Алания (3,4%). Тем не менее в РК преобладали безработные, работающие по найму, выполняющие сезонные работы, в том числе вахтовые, пенсионеры по возрасту и инвалидности, составившие в сумме 55,0% против 32,3% таковых в РСО-Алания ($p < 0,000$). Работающих по контракту в обоих регионах было мало, меньше 2,0%. Проблемы безработицы в регионе были признаны большинством респондентов как в РК (80,3%), так и в РСО-Алания (78,0%).

Ежемесячная зарплата у более чем 60,0% респондентов в обоих регионах составила от 10 000 до 30 000 руб. в месяц (рис. 4В). Респондентов, имеющих зарплату более 30 000 руб. в месяц, было достоверно больше в РК (29,6%), чем в РСО-Алания (13,1%, $p < 0,000$), однако в РК было больше лиц, живущих преимущественно на пенсионные выплаты, чем в РСО-Алания (19,4% против 5,3%, $p < 0,000$). Доля живущих преимущественно на пособие по безработице и на продуктах собственного натурального хозяйства была незначительна в том и другом регионе, составив от 0,5% до 3,0% соответственно в РК и РСО-Алания.

Поведенческие факторы риска заболевания ТБ были более выражены в РК, нежели в РСО-Алания (рис. 5А). В РК доля употребляющих алкоголь в целом была в 2 раза, а доля «тяжелых» курильщиков (курение по 1 пачке и более сигарет в день) в 3 раза выше, чем в РСО-Алания ($p < 0,000$) (рис. 5Б). Пребывание в МЛС было отмечено несколько чаще в РСО-Алания, чем в РК (6,8% против 4,9%).

В РСО-Алания респондентов, считающих себя здоровыми, было достоверно больше, чем в РК: 59,8% против 50,1%, $p < 0,002$ (рис. 5Б). В РК анкетированные чаще отмечали наличие хронических заболеваний, таких как сахарный диабет, бронхиальная астма, заболевания желудочно-кишечного тракта, чем в РСО-Алания (43,7% против 32,1%, $p < 0,000$). На постоянное болезненное самочувствие указала небольшая часть респондентов: в РК — 6,2%, в РСО-Алания — 7,9%.

В РК более половины участников к основным причинам плохого здоровья отнесли экологические проблемы, тогда как в РСО-Алания эту проблему признала лишь около $\frac{1}{4}$ части респондентов ($p < 0,000$) (рис. 4В). Также в РК около $\frac{1}{3}$ части анкетированных свое плохое здоровье связали с плохим питанием из-за материального недостатка, в РСО-Алания доля таковых была около $\frac{1}{4}$ части ($p < 0,000$). В том и другом регионе на нехватку средств для лечения указала $\frac{1}{5}$ часть, а на тяжелый труд как на причину плохого здоровья — лишь малая часть респондентов.

При оценке доступности медицинской помощи населению на уровне первичной медико-санитарной помощи в РК, по отношению к РСО-Алания, в 1,5 раза преобладало оказание помощи врачебными амбулаториями (ВА), в 6 раз — фельдшерско-акушерскими пунктами (ФАП) и в 4 раза — выездными бригадами специалистов ($p < 0,000$) (рис. 6А).

Также в РК доля респондентов, указавших на отсутствие МО на территории своего проживания, была достоверно выше, чем в РСО-Алания (3,1% против 0,3%, $p < 0,000$). В РСО-Алания, напротив, в два раза чаще, чем в РК, медицинская помощь населению оказывалась районными поликлиниками (85,6% против 42,7%, $p < 0,000$).

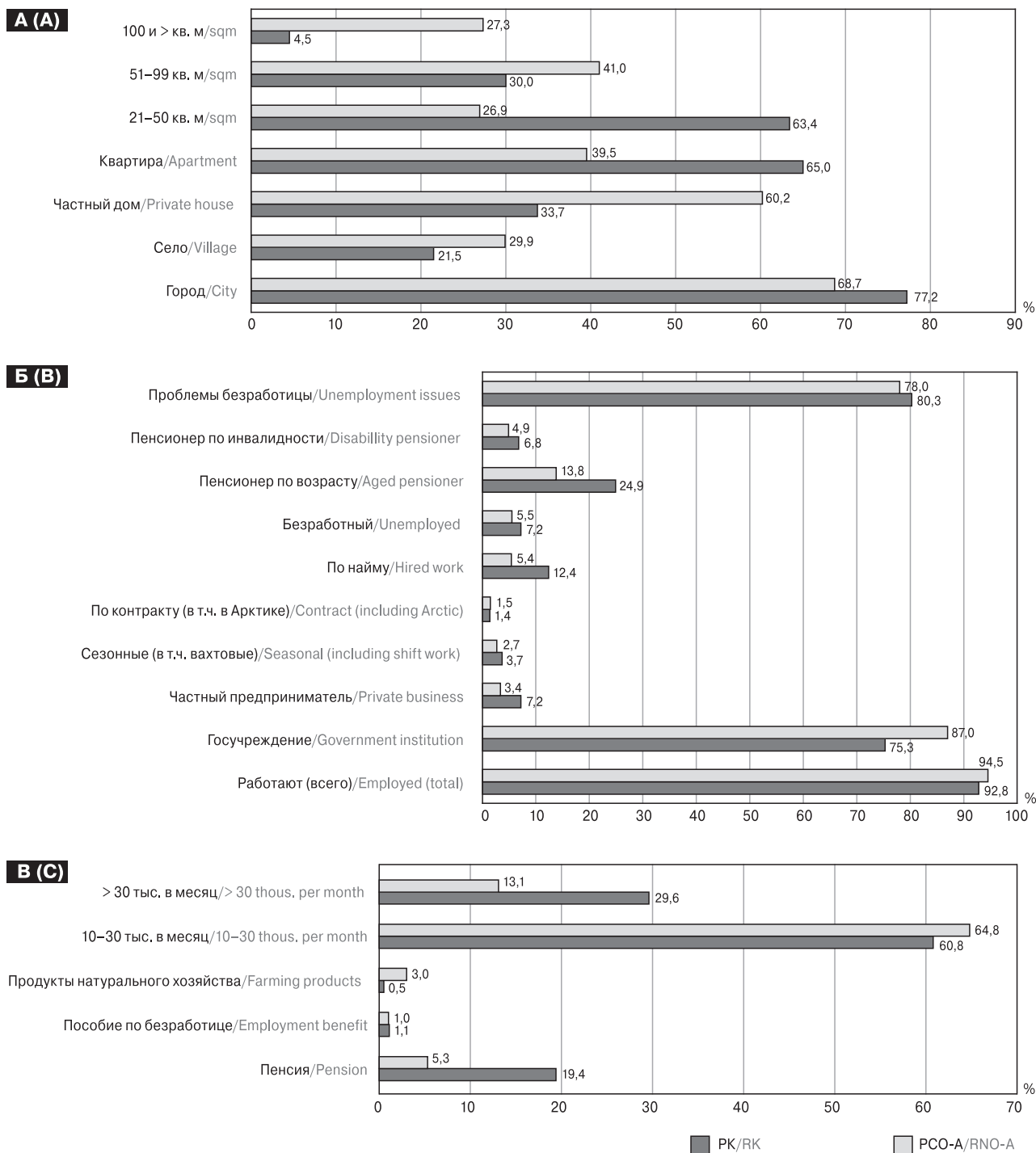


Рисунок 4. Социально-экономические факторы риска: 4А — место и условия проживания, 4Б — наличие и вид работы, 4В — доходы

Figure 4. Socio-economic risk factors: 4A — location and living conditions, 4B — availability and type of work, 4C — income

В РК респонденты достоверно чаще, чем в РСО-Алания, имели проблемы, связанные с доступностью медицинской помощи (рис. 6B): в 3 раза чаще отмечены плохие дороги и отсутствие аптек, в 2 раза чаще — отсутствие транспортного сообщения, в 8 раз чаще — дальнейшее расположение МО, и более 60,0% участников указали на отсутствие врачей-специалистов (стоматолог, гинеколог, кардиолог), что почти в 4 раза выше, чем в РСО-Алания ($p < 0,000$). На использование устаревшего медицинского оборудования, по субъективной оценке, указали около 1/5 части респондентов без достоверных различий в регионах ($p > 0,05$).

К эпидемиологическим факторам риска мы отнесли ответы респондентов на вопрос «Знаете ли Вы что такое туберкулез?», косвенно отражающие уровень или частоту тубконтактов в окружении респондента (рис. 7). В РСО-Алания около 70,0% респондентов указали на то, что их близкий и дальний родственник, также сосед и коллега болели ТБ, тогда как в РК доля таковых составила чуть более 1/3 части участников ($p < 0,000$). В РК анкетируемые также меньше, чем в РСО-Алания придали значение трудовой миграции как источнику распространения инфекционных заболеваний. Доля перенесших самим ТБ в том и другом регионе была почти равной, составив в РК 9,7%, РСО-Алания — 9,4%.

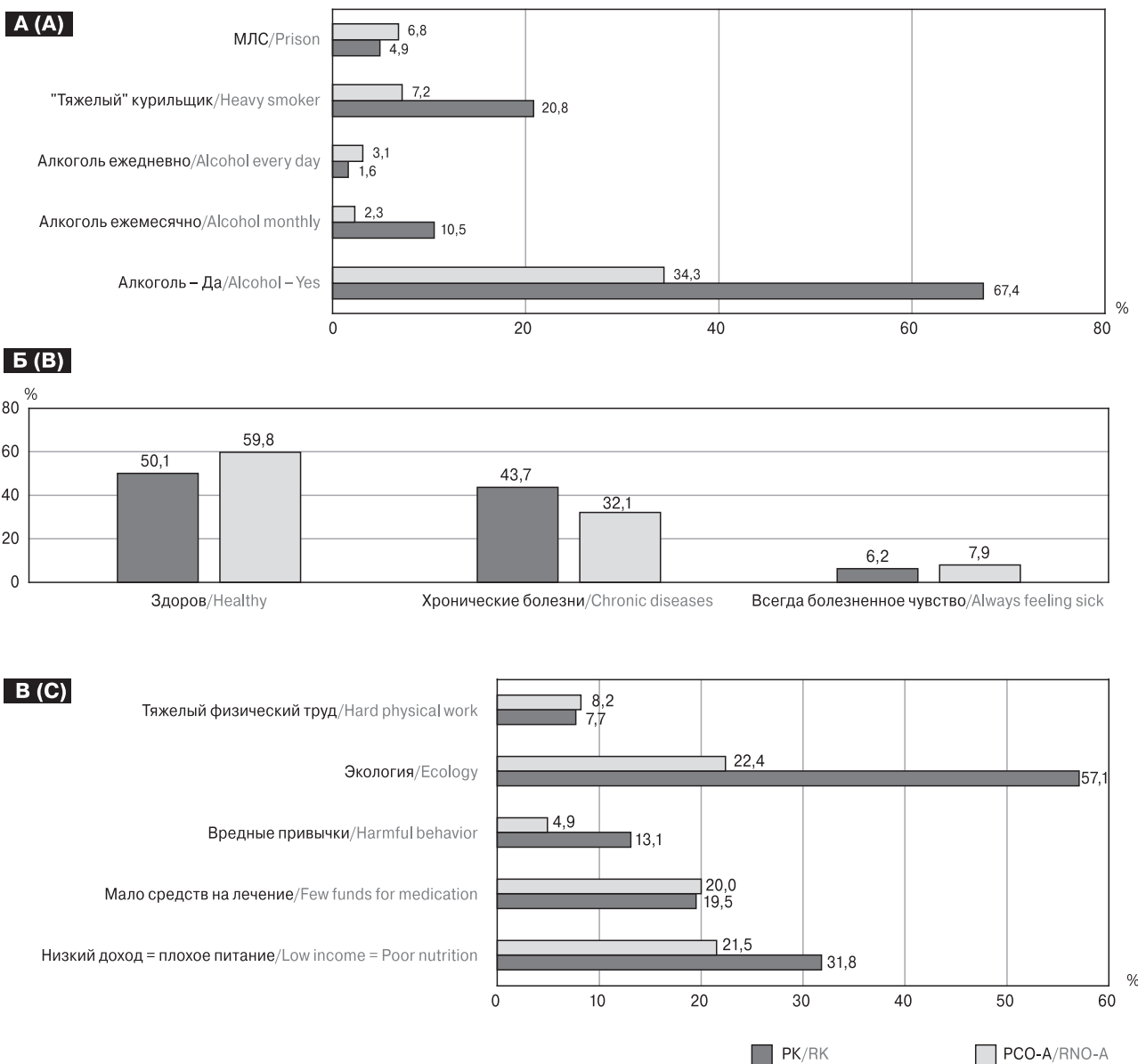


Рисунок 5. Поведенческие и медико-социальные факторы риска: 5А — вредные привычки и проблемы с правовыми органами, 5Б — самооценка состояния здоровья, 5В — причины плохого здоровья

Figure 5. Behavioral and medico-social risk factors: 5A — bad habits and problems with legal authorities, 5B — health self-assessment, 5C — causes of poor health

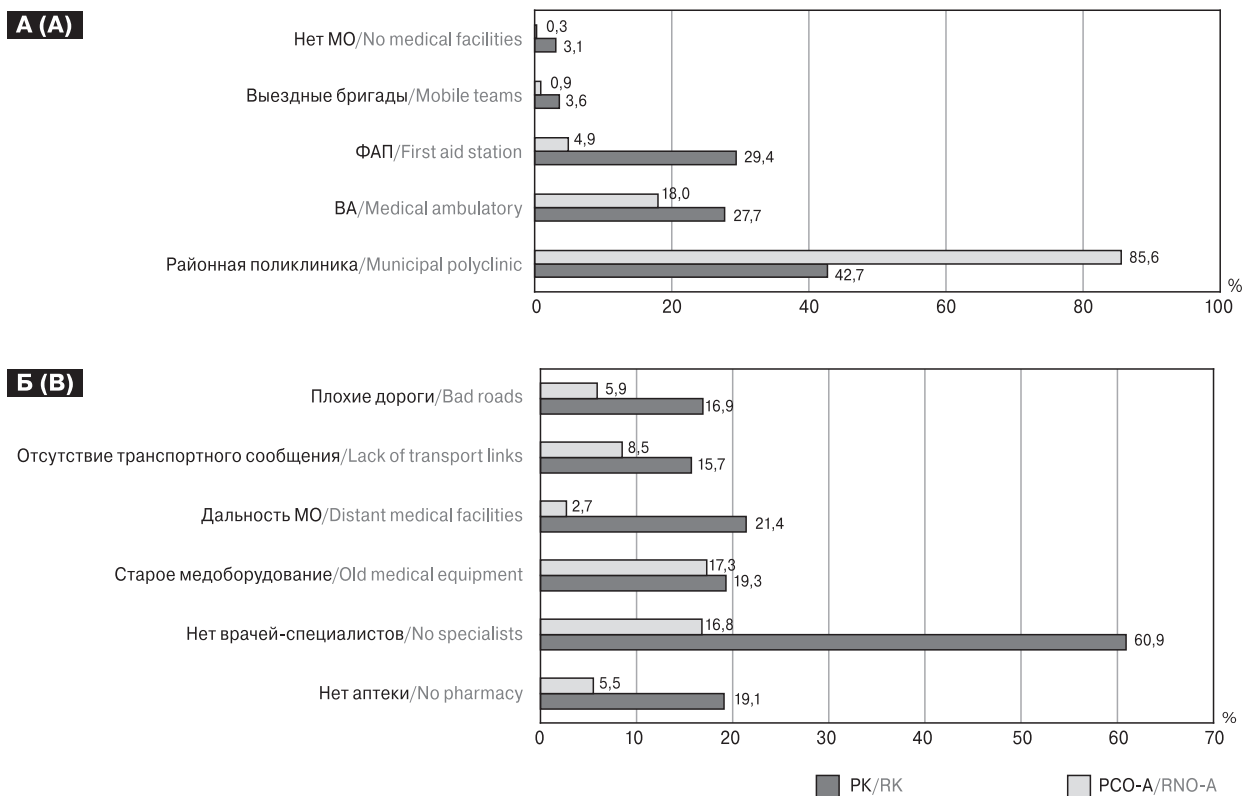


Рисунок 6. Медико-организационные факторы: 6А — виды медицинских организаций первичной медико-санитарной помощи, 6Б — проблемы доступа к медицинской помощи

Figure 6. Health care management factors: 6A — types of medical facilities in primary health care, 6B — problems with medical care access

Обсуждение

Результаты социологического исследования, проведенного в двух существенно отличающихся по плотности населения субъектах РФ (РК и РСО-Алания), подтвердили нашу гипотезу о преобладании эпидемиологического фактора риска распространения ТБ в регионе с высокой плотностью населения. В РСО-Алания, в от-

личие от РК, несмотря на более низкий уровень ВРП и более низкие доходы населения, большинство, как социально-экономических, так и медико-социальных и поведенческих, факторов риска заболевания ТБ оказались менее выраженными, а социальные контакты респондентов с больными ТБ отмечались чаще. В РК, арктическом регионе с низкой плотностью населения, ведущими факторами риска

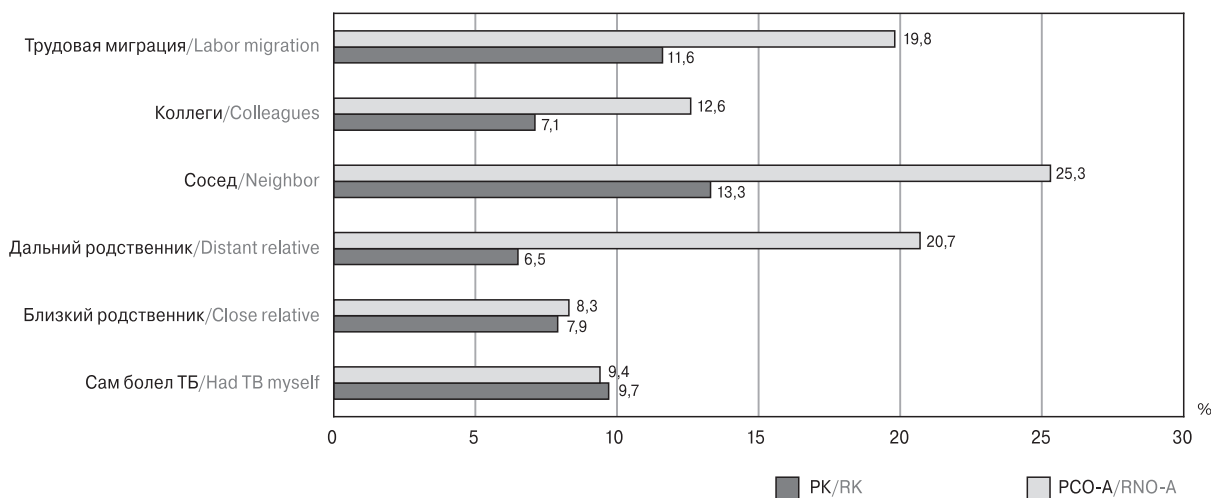


Рисунок 7. Эпидемиологические факторы риска распространения туберкулеза

Figure 7. Epidemiological risk factors for tuberculosis spread

распространения ТБ кроме поведенческих, социально-экономических, медико-социальных паттернов оказались медико-организационные: низкая доступность медицинской помощи из-за отдаленности проживания, недостатка врачей-специалистов и пр.

Полагаем, что наше исследование является первой работой, где проведена полноценная оценка выраженности структурированных факторов риска распространения ТБ в зависимости от плотности населения, с учетом здоровьесберегающих и других традиций среди различных по этническому составу жителей регионов России

Исследований, связанных с изучением распространения инфекционных заболеваний, передающихся воздушно-капельным путем, преимущественно вирусных, в зависимости от интенсивности социальных контактов в научных публикациях достаточно много. Авторский коллектив из 35 стран, изучив контакты 3,5 млрд людей дома, в школе, на работе и в социуме, разработали математическую матрицу смешения социума, и показали зависимость эпидемического процесса от интенсивности социальных контактов, что в свою очередь определялась социально-экономическими, демографическими, культурными и другими различиями стран [35]. В другой работе, наоборот, авторы, изучив ежедневные социальные контакты 7290 респондентов в 8 европейских странах, пришли к выводу о схожести паттернов смешения социума: школьники и молодые люди предпочитали общаться со своими сверстниками, и среди них заболевание вирусными инфекциями было самым высоким в начале эпидемии гриппа и SARS, что должно учитываться при разработке мер по контролю за распространением вирусных инфекций [35]. Исследователи из Замбии и Южной Африки установили, что население чаще имеет социальные контакты с взрослыми больными ТБ, преимущественно мужчинами и чаще в сельской местности [28]. В нашем исследовании мы не изучали интенсивность, половозрастные паттерны и территориальные особенности социальных контактов населения с больными ТБ. Этим вопросам будут посвящены последующие исследования.

Одним из ограничений настоящего исследования являлось включение пациентов с активным ТБ, состоящих на учете в противотуберкулезных МО, составивших до 6,0% от общего числа респондентов пилотных регионов, что может несколько усилить некоторые факторы риска ТБ, особенно социально-экономические. Другим ограничением было малое количество сравниваемых регионов (всего 2), что недостаточно для математического моделирования влияния структурированных факторов риска

на распространение ТБ в регионах с различной плотностью населения. Математическое моделирование широко используется в научно-практическом мире для прогнозирования влияния на общественное здоровье биологических вызовов, например таких, как пандемия COVID-19 [7, 37]. Следовательно, сохраняющиеся темпы распространения социально значимых инфекций (ТБ, ВИЧ-инфекция, их сочетание, парентеральные вирусные гепатиты и др.) в России указывают на необходимость продолжения подобных исследований с учетом особенностей различных субъектов РФ, в том числе плотности населения, по разработанной нами стандартной методике с последующим построением математической модели для прогнозирования и управления эпидемическим процессом.

Заключение

В регионах с высокой плотностью населения распространение ТБ преимущественно обусловлено эпидемиологическими факторами, которые достоверно чаще преобладали в РСО-Алания (до 70,0% респондентов указали на наличие контактов с больным ТБ родственником, соседом, коллегой, в РК — около 35,0%), где плотность населения в 29 раз превышает плотность населения РК. В РК, арктическом регионе с низкой плотностью населения, ведущими факторами заболевания ТБ были социально-экономические (респонденты чаще одинокие, чаще проживают в многоквартирных домах с малой площадью, чаще выполняют сезонные работы или работы по найму, чаще живут только на пенсию); поведенческие (анкетированные чаще употребляют алкоголь, чаще курят, реже соблюдают здоровьесберегающие традиции); медико-организационные (меньше здоровых по самооценке, больше имеющих хронические заболевания, чаще плохое здоровье связано с плохим питанием из-за материального недостатка; низкая доступность медицинской помощи чаще связано с отдаленностью МО, плохими дорогами и плохим транспортным сообщением, отсутствием врачей-специалистов).

При разработке НПА по противодействию распространению социально значимых инфекций, в том числе ТБ, необходимо учитывать особенности и превалирование тех или иных факторов риска распространения заболевания в конкретном регионе. Результаты подобных социологических исследований должны широко обсуждаться в научном сообществе и доводиться до региональных правительств для принятия адекватных управленческих решений для снижения бремени СЗИЗ, влияющих на общественное здоровье.

Список литературы/References

1. Азовцева О.В., Пантелеев А.М., Карпов А.В., Архипов Г.С., Вебер В.Р., Беляков Н.А., Архипова Е.И. Анализ медико-социальных факторов, влияющих на формирование и течение коинфекции ВИЧ, туберкулеза и вирусного гепатита // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 787–799. [Azovtzeva O.V., Panteleev A.M., Karpov A.V., Arkhipov G.S., Weber V.R., Belyakov N.A., Arkhipov E.I. Analysis of medical and social factors affecting the formation and course of co-infection HIV, tuberculosis and viral hepatitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 787–799 (In Russ.). doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-787-799]
2. Баянова Н.А., Пужалин Я.Д., Мамедов В.Г. Плюсы и минусы системы здравоохранения на примере системы Н.А. Семашко // Молодой ученый. 2016, Т. 130, № 26. С. 196–199. [Bayanova N.A., Puzhalin Ya.D., Mamedov V.G. Pro and contra to the N.A. Semashko health care system. *Molodoi uchenyi = Yang Scientist (Russia)*, 2016, vol. 130, no. 26, pp. 196–199. (In Russ.)]
3. Богородская Е.М., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Рыбка Л.Н., Петров В.А., Матвеева М.В. Заболеваемость туберкулезом мигрирующего населения и лиц БОМЖ в городе Москве // Туберкулез и социально значимые заболевания. 2014. № 5. С. 3–17. [Bogorodskaya E.M., Belilovskiy E.M., Borisov S.E., Ry'bka L.N., Petrov V.A., Matveeva M.V. Tuberculosis incidence in the migrants and homeless in Moscow. *Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolevaniya = Tuberculosis and Socially Significant Diseases*, 2014, no. 4, pp. 3–17 (In Russ.)]
4. Быков И.А. Социально-демографические факторы, способствующие распространению туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в Российской Федерации: систематический обзор // Туберкулез и болезни легких. 2022. Т. 100, № 6. С. 59–65. [Bykov I.A. Social and demographic factors contributing to the spread of multiple drug resistant tuberculosis in the Russian Federation: a systematic review. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2022, vol. 100, no. 6, pp. 59–65. (In Russ.) doi: 10.21292/2075-1230-2022-100-6-59-6]
5. Васильева И.А., Борисов С.Е., Сон И.М., Попов С.А., Нецаева О.Б., Белиловский Е.М., Данилова И.Д. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Туберкулез в Российской Федерации 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М.: 2015. С. 196–223. [Vasil'eva I.A., Borisov S.E., Son I.M., Popov S.A., Nechaeva O.B., Belilovskiy E.M., Danilova E.D. Multidrug resistance tuberculosis. Tuberculosis in the Russian Federation 2012/2013/2014. Analytical review of statistical indicators used in the Russian Federation and in the world. *Moscow*, 2015, pp. 196–223. (In Russ.)]
6. Васильева Т.П., Ларионов А.В., Русских С.В., Зудин А.Б., Васюнина А.Е., Васильев М.Д. Методические подходы к измерению общественного здоровья как медико-социального ресурса и потенциала общества // Здоровье населения и среда обитания — ЗНиСО. 2022. Т. 30, № 11. С. 7–15. [Vasilieva T.P., Larionov A.V., Russkikh S.V., Zudin A.B., Vasunina A.E., Vasiliev M.D. Calculation of the public health index in the regions of the Russian Federation. *Zdorov'e nasele-niya i sreda obitaniya — ZNiSO = Public Health and Life Environment — PH&LE*, 2022, vol. 30, no. 12, pp. 7–16. (In Russ.)] doi: 10.35627/2219-5238/2022-30-11-7-15
7. Володин А.В., Луцай Е.Д., Кононова М.В. Математическое моделирование как эффективный инструмент управления проблемами общественного здоровья — международный опыт // Оренбургский медицинский вестник. 2021. Т. 9, № 3 (35). С. 5–7. [Volodin A.V., Lutsay E.D., Kononova M.V. Mathematical modeling as an effective tool for managing public health problems — international experience. *Orenburgskii meditsinskii vestnik = Orenburg Medical Herald*, 2021, vol. 9, no. 3 (35), pp. 5–7. (In Russ.)]
8. Гельберг И.С., Вольф С.Б., Алексю Е.Н., Авласенко В.С., Коломиец В.М., Коноркина Е.А. Факторы риска развития туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Человек и его здоровье. 2015. № 1. С. 17–22. [Gelberg I.S., Wolf S.B., Alekso E.N., Avlasenko V.S., Kolomiets V.M., Konorkina E.A. Risk factors of multidrug resistant tuberculosis development. *Chelovek i ego zdorov'e = Humans and Their Health*, 2015, no. 1, pp. 17–22. (In Russ.)]
9. Голубев Д.Н., Егорова О.С., Медвинский И.Д., Голубев Ю.Д. Заболеваемость туберкулезом медицинских работников в противотуберкулезных учреждениях Свердловской области // Уральский медицинский журнал. 2014. Т. 120, № 6. С. 102–107. [Golubev D.N., Egorova O.S., Medvinskiy I.D., Golubev U.D. The incidence of TB health workers in TB facilities of the Sverdlovsk region. *Ural'skii meditsinskii zhurnal = Ural Medical Journal*, 2014, vol. 120, no. 6, pp. 102–107. (In Russ.)]
10. Деларю В.В. Конкретные социологические исследования в медицине. Волгоград, 2005. 97 с. [Delarue V.V. Specific so-ciological studies in medicine. *Volgograd*, 2005. 97 p. (In Russ.)]
11. Ильясов Ф.Н. Алгоритмы формирования выборки социологического опроса // Социальные исследования. 2017. № 2. С. 60–75. [Iliassov F.N. Algorithms for forming of a sample of sociological survey. *Sotsial'nye issledovaniya = Social Researches*, 2017, no. 2, pp. 60–75. (In Russ.)]
12. Капков Л.П. Неизвестные страницы истории организации советской фтизиатрической службы // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2003. № 8. С. 50–55. [Karpov L.P. Unknown pages of history of organization of the Soviet TB care. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2003, no. 8, pp. 50–55. (In Russ.)]
13. Лопакон К.В., Сабгайда Т.П., Попов С.А. Новый интегральный показатель «Эпидемиологический потенциал туберкулеза» // Социальные аспекты здоровья населения. 2009. № 1. [Lopakov K.V., Sabgayda T.P., Popov S.A. New inte-grated indicator “Tuberculosis epidemiological potential”. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya = Social Aspects of Population Health*, 2009, no. 1. (In Russ.)] URL: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/105/30/lang,ru>
14. Морева А.Ю., Байке Е.Е. Туберкулез у облучаемых лиц: результаты проспективного исследования // Забайкальский медицинский вестник. 2017. № 5. С. 103–110. [Moreva A.Yu., Bayke E.E. Tuberculosis in the irradiated peoples. The re-sults of a prospective study. *Zabaikal'skii meditsinskii vestnik = Zabaykalsk Medical Bulletin (Russia)*, 2017, no. 4, pp. 103–110. (In Russ.)] doi: 10.52485/19986173_2017_4_103
15. Наркевич А.Н., Виноградов К.А. Методы определения минимально необходимого объема выборки в медицинских исследованиях // Социальные аспекты здоровья населения. 2019. Т. 65, № 6. [Narkevich A.N., Vinogradov K.A. Methods

- for determining the minimum required sample size in medical research. *Social'ny'e aspekty' zdorov'ya naseleniya = Social Aspects of Population Health (Russia)*, 2019, vol. 65, no. 6. (In Russ.)] doi: 10.21045/2071-5021-2019-65-6-10
16. Наркевич А.Н., Корецкая Н.М., Виноградов К.А., Наркевич А.А. Влияние возраста, пола и социальных факторов на риск выявления туберкулеза легких // Пульмонология. 2013. № 5. С. 73–76. [Narkevich N.A., Koretzkaya N.M., Vinogradov K.A., Narkevich A.A. Influence of age, gender and social factors on the risk of finding of pulmonary tuberculosis. *Pul'monologiya = Pul'monologiya*, 2013, no. 4, pp. 73–76. (In Russ.)]
 17. Нечаева О.Б. Мониторинг туберкулеза и ВИЧ-инфекции в Российской Федерации // Медицинский алфавит. 2017. Т. 3, № 30. С. 24–33. [Nechaeva O.B. Monitoring of tuberculosis and HIV-infection in the Russian Federation. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2017, vol. 3, no. 30, pp. 24–33. (In Russ.)]
 18. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих: Постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2004 г. № 715 (ред. от 31.01.2020 г.) [On approval of the list of socially significant diseases and the list of diseases that pose a danger to others: Decree of the Government of the Russian Federation dated December 1, 2004 no. 715 (as amended on January 31, 2020) (In Russ.)] URL: <http://www.consultant.ru> (10.09.2023)
 19. Паролина Л.Е., Докторов Н.П., Отпущенникова О.Н. Социально-экономические детерминанты и математическое моделирование в эпидемиологии туберкулеза (обзор литературы) // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 6. [Parolina L.E., Doktorova N.P., Otpyschenkova O.N. Socio-economic determinants and mathematical modeling in the epidemiology of tuberculosis (literature review). *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2020, no. 6. (In Russ.)] doi: 10.17513/spno.30333
 20. Пасечник О.А., Плотникова О.В. Профессиональная заболеваемость туберкулезом медицинских работников Омской области // Гигиена и санитария. 2015. Т. 94, № 8. С. 23–26. [Pasechnik O.A., Plotnikova O.V. Occupational prevalence of Mycobacterium Tuberculosis infection among health workers. *Gigiya i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2015, vol. 94, no. 8, pp. 23–26. (In Russ.)]
 21. Репина О.В., Скорняков С.Н., Голубкова А.А. К вопросу заболеваемости туберкулезом контактных в семейно-квартирных очагах туберкулезной инфекции // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2015. № 1. С. 13–17. [Repina O.V., Skorniyakov S.N., Golubkova A.A. To the problem of sickness rate of tuberculosis by contacts within family housing focus of tubercular infection. *Vestnik Ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2015, no. 1, pp. 13–17. (In Russ.)]
 22. Сурмач М.Ю. Медико-социологическое исследование: стандартизация планирования, особенности программы сбора материала // Медицинские новости. 2017. № 1. С. 19–26. [Surmach M.Yu. Medical-sociological study: standardization of planning, peculiarities of data collection. *Medicinskie novosti = Medical News*, 2017, no. 1, pp. 19–26. (In Russ.)]
 23. Хабриев Р.У., Линденбратен А.Л., Комаров Ю.М. Стратегия охраны здоровья населения как основа социальной политики государства // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2014. Т. 22, № 3. С. 3–5. [Khabriev R.U., Lindenbraten A.L., Komarov Yu.M. The strategy of health care of population as a background of public social policy. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine (Russia)*, 2014, vol. 22, no. 3, pp. 3–5. (In Russ.)]
 24. Щепин В.О., Зудин А.Б. Механизмы организации и проведения первичной профилактики онкологических заболеваний // Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья имени Н.А. Семашко. 2012. Т. 3, № 57. [Schepin V.O., Zudin A.B. Mechanisms for organizing and providing primary prevention measures of oncological diseases. *Byulleten Nacionalnogo nauchnoissledovatel'skogo instituta obshhestvennogo zdorov'ya imeni N.A. Semashko = Bulletin of Semashko National Research Institute of Public Health*, 2012, vol. 3, no. 47. (In Russ.)]
 25. Amoori N., Cheraghian B., Amini P., Alavi S.M. Social contacts patterns associated with tuberculosis: a case-control study in Southwest Iran. *J. Prev. Med. Public. Health*, 2022, no. 55, pp. 485–491. doi: 10.3961/jpmph.22.335
 26. Awad S.F., Dargham S.R., Omori R., Pearson F., Critchley J.A., Abu-Raddad L.J. Analytical exploration of potential pathways by which Diabetes Mellitus Impacts tuberculosis epidemiology. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 8494. doi: 10.1038/s41598-019-44916-7
 27. Byrne A.L., Marais B.J., Mitnick C.D., Lecca L., Marks G.B. Tuberculosis and chronic respiratory disease: a systematic review. *Int. J. Inf. Dis.*, 2015, vol. 32, pp. 138–146. doi: 10.1016/j.ijid.2014.12.016
 28. Dodd P.J., Looker C., Plumb I.D., Bond V., Schaap Ab., Shanaube K., Muyoyeta M., Vynucky E., Godfrey-Faussett P., Corbett E.L., Beyers N., Ayles H., White R.D. Age- and sex-specific social contact patterns and incidence of Mycobacterium Tuberculosis infection. *Am. J. Epidemiol.*, 2016, vol. 183, no. 2, pp. 156–166. doi: 10.1093/aje/kwv160
 29. Duarte R., Lönnroth K., Carvalho C., Lima F., Carvalho A.C.C., Munoz-Torico M., Centis R. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). *Pulmonology*, 2018, vol. 24, no. 2, pp. 115–119. doi: 10.1016/j.rppnen.2017.11
 30. Gilmour B., Xu Z., Bai L., Alene K.A., Clements A.C.A. Risk factors associated with unsuccessful tuberculosis treatment outcomes in Hunan Province, China. *Trop. Med. Int. Health*, 2022, vol. 27, no. 3, pp. 290–299. doi: 10.1111/tmi.13720
 31. Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO, 2022.
 32. Gupta R.K., Lipman M., Story A., Hayward A., de Vries G., van Hest R., Erkens C., Rangaka M.X., Abubakar I. Active case finding and treatment adherence in risk groups in the tuberculosis pre-elimination era. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 2018, vol. 22, no. 5, pp. 479–487. doi: 10.5588/ijtld.17.0767
 33. Lai P.C., Low C.T., Tse W.S., Tsui C.K., Lee H., Hui P.K. Risk of tuberculosis in high-rise and high density dwellings: an exploratory spatial analysis. *Environ. Pollut.*, 2013, no. 183, pp. 40–45. doi: 10.1016/j.envpol.2012.11.025
 34. Millet J.P., Moreno A., Fina L., del Baño L., Orcau A., de Olalla P.G., Caylà J.A. Factors that influence current tuberculosis epidemiology. *Eur. Spine. J.*, 2013, 22 (suppl. 4), pp. 539–548. doi: 10.1007/s00586-012-2334-8
 35. Mistry D., Litvinova M., Pastore Y Piontti A., Chinazzi M., Fumanelli L., Gomes M.F.C., Haque S.A., Liu Q-H., Mu K., Xiong X., Halloran M.E., Longini I.M. Jr., Merler S., Ajelli M., Vespignani A. Inferring high-resolution human mixing patterns for diseases modeling. *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 323. doi: 10.1038/s41467-020-20544-y

36. Workneh M.H., Bjune G.A., Yimer S.A. Prevalence and associated factors of tuberculosis and diabetes mellitus comorbidity: a systematic review. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 4: e0175925. doi: 10.1371/journal.pone.0175925
37. Xia Z.-Q., Zhang J., Xuel Y.-K., Sun G.-Q., Jin Z. Modeling the Transmission of Middle East Respirator Syndrome Corona Virus in the Republic of Korea. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 12: e0144778. doi: 10.1371/journal.pone.0144778
38. Yablonskii P.K., Vizel A.A., Galkin V.B., Shulgina M.V. Tuberculosis In Russia. Its history and its status today. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, vol. 191, no. 4, pp. 372–376. doi: 10.1164/rccm.201305-0926OE

Авторы:

Загдын З.М., д.м.н., профессор кафедры общественного здоровья и здравоохранения, ведущий научный сотрудник ФГБНУ Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия;

Зудин А.Б., д.м.н., профессор, директор ФГБНУ Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия;

Кобесов Н.В., к.м.н., главный врач ГБУЗ РСО-Алания Республиканский клинический центр фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения РСО-Алания, г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Васильева Т.П., д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный научный сотрудник ФГБНУ Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия;

Галоян А.С., аспирант ФГБНУ Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Россия;

Вербицкая Е.В., доцент кафедры клинической фармакологии и доказательной медицины, зав. отделом фармакоэпидемиологии и биомедицинской статистики ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Zagdyn Z.M., DSc (Medicine), Professor of the Department Public Health and Healthcare, Leading Researcher, N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation;

Zudin A.B., DSc (Medicine), Professor, Director of the N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation;

Kobesov N.V., PhD (Medicine), Head Physician of the Republic Clinical Center of Phthiopulmonology of Ministry of Health of the Republic of North Ossetia — Alania, Vladikakaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation;

Vasileva T.P., DSc (Medicine), Professor, Honored Physician of the Russian Federation, Head Researcher, N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation;

Galoyan A.S., PhD Student, N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation;

Verbitskaya E.V., Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Head of the Department of Pharmacoevidence and Biomedical Statistics, I. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.10.2023
Отправлена на доработку 25.02.2024
Принята к печати 25.05.2024

Received 11.10.2023
Revision received 25.02.2024
Accepted 25.05.2024

ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS AND VIRULENCE DETERMINANTS OF CLINICAL ENTEROCOCCUS ISOLATES IN PAKISTAN

J. Ullah^a, A. Aziz^a, A. Ullah^a, I. Ullah^a, A. Jabbar^a, M. Umair^b, M. Ullah^b, H. Ullah^c, M. Ullah^b, I. Ali^b

^a The University of Haripur, KPK, Pakistan

^b Khyber Medical University, Peshawar, KP, Pakistan

^c Saidu Group of Teaching Hospitals, Saidu Sharif, Swat, KP, Pakistan

Abstract. *Background.* The current study was designed to determine antibiotic resistance profile, detection of antimicrobial resistance and virulence-related genes among enterococcus species. *Materials and methods.* Altogether, one hundred fifty enterococcal isolates were collected from various clinical specimens and identified by Polymerase chain reaction (PCR). Antibiotic susceptibility testing and MICs of vancomycin were carried out as per CLSI guidelines. A series of PCR reactions were used to screen vancomycin-resistant genes (*vanA*, *vanB*, and *vanD*) and virulence-related genes (*esp*, *ace*, *asaI*, *gelE* & *cylA*) among VRE enterococcus species. *Results.* The isolated enterococcal strains comprised 62.6% *E. faecalis*, 33.4% *E. faecium*, and 4% of other species. Overall enterococcus showed a high level of resistance; 94% to erythromycin, followed by ciprofloxacin 82.6%, levofloxacin 70%, and vancomycin 16%. The 57.4% of the isolates were recovered from hospitalized patients and 96% of the enterococcus isolates were multi-drug resistant. The MICs of vancomycin-resistant strains remained in the range of 32 µg/ml to 256 µg/ml for the majority of the isolates. The vancomycin-resistant phenotypes *vanA*, *vanB*, and *vanD* were found in 29.2%, 37.5%, and 33.3% isolates respectively. Regarding virulence determinants the observed percentages were as follows; *esp*: 16.6%, *asaI*: 70.8%, *gelE*: 25%, *ace*: 33.3%, and *cylA*: 25%. *Conclusion.* The majority of the isolates were *E. faecalis* and multi-drug resistant. The VRE isolates carried antimicrobial resistance and virulence-related genes, and *vanA*, B, D phenotypes were the most common among VRE isolates.

Key words: antimicrobial resistance, *Enterococcus*, minimum inhibitory concentration, vancomycin resistant enterococci, virulence factors, antimicrobial resistance gene.

СТРУКТУРА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТЕРОКОККА В ПАКИСТАНЕ

Улла Д.¹, Азиз А.¹, Улла А.¹, Улла И.¹, Джаббар А.¹, Умейр М.², Улла М.², Улла Х.³, Улла М.², Али И.²

¹ Университет Харипура, КПК, Пакистан

² Хайберский медицинский университет, Пешавар, КПК, Пакистан

³ Группа Сайду клинической больницы, Сайду-Шариф, Сват, КПК, Пакистан

Резюме. Настоящее исследование было разработано для определения у разных видов энтерококков профиля устойчивости к антибиотикам, выявления устойчивости к противомикробным препаратам и генов, связанных с вирулентностью. *Материалы и методы.* Всего было собрано 150 изолятов энтерококков из различных

Адрес для переписки:

Али Ихан
Тел.: (091) 921-77-03.
E-mail: ihsan.ipms@kmu.edu.pk; ihsanmicro@gmail.com

Contacts:

Ihsan Ali
F1 Phase-6 Rd, Phase 5 Hayatabad, Peshawar,
Khyber Pakhtunkhwa 25100.
Phone: (091) 921-77-03.
E-mail: ihsan.ipms@kmu.edu.pk; ihsanmicro@gmail.com

Для цитирования:

Улла Д., Азиз А., Улла А., Улла И., Джаббар А., Умейр М., Улла М., Улла Х., Улла М., Али И. Структура устойчивости к антимикробным препаратам и факторы вирулентности клинических изолятов энтерококка в Пакистане // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 995–1001. doi: 10.15789/2220-7619-ARP-17642

Citation:

Ullah J., Aziz A., Ullah A., Ullah I., Jabbar A., Umair M., Ullah M., Ullah H., Ullah M., Ali I. Antimicrobial resistance patterns and virulence determinants of clinical *Enterococcus* isolates in Pakistan // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 995–1001. doi: 10.15789/2220-7619-ARP-17642

клинических образцов. Эти изоляты были идентифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Тестирование чувствительности к антибиотикам и определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ванкомицина проводились в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Серия реакций ПЦР использовалась для скрининга генов устойчивости к ванкомицину (*vanA*, *vanB* и *vanD*) и генов вирулентности (*esp*, *ace*, *asa1*, *gelE* и *cylA*) среди видов ванкомицинрезистентных энтерококков (ВРЭ). **Результаты.** Выделенные штаммы энтерококков включали 62,6% *E. faecalis*, 33,4% *E. faecium* и 4% других видов. В целом энтерококки показали высокий уровень устойчивости: 94% — к эритромицину, за которым следуют ципрофлоксацин (82,6%), левофлоксацин (70%) и ванкомицин (16%). 57,4% изолятов были получены от госпитализированных пациентов, 96% изолятов энтерококков имели множественную лекарственную устойчивость. МИК для ВРЭ штаммов большинства изолятов варьировали в диапазоне от 32 мкг/мл до 256 мкг/мл. ВРЭ фенотипы в виде *vanA*, *vanB* и *vanD* были обнаружены у 29,2%, 37,5% и 33,3% изолятов соответственно. В отношении факторов вирулентности, получены следующие распределения: *esp* — 16,6%, *asa1* — 70,8%, *gelE* — 25%, *ace* — 33,3% и *cylA* — 25%. **Заключение.** Большинство изолятов были *E. faecalis* и имели множественную лекарственную устойчивость. ВРЭ изоляты несли гены устойчивости к противомикробным препаратам и гены, связанные с вирулентностью, а фенотипы *vanA*, *vanB*, *vanD* были наиболее распространены среди ВРЭ изолятов.

Ключевые слова: устойчивость к противомикробным препаратам, энтерококки, минимальная ингибирующая концентрация, ванкомицинрезистентные энтерококки, факторы вирулентности, ген устойчивости к противомикробным препаратам.

Introduction

Enterococci persistently emerged as important nosocomial pathogens globally and cause a wide range of infections such as bacteremia, meningitis, urinary tract infections, intra-abdominal and soft tissue infections, etc. [1]. The majority of the clinical enterococcal infections are caused by two species; *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [2]. Due to the frequent use of antibiotics in clinical practices, the emergence and spread of multi-drug-resistant enterococci such as vancomycin-resistant enterococci (VRE) has been observed [1]. Globally, this rapid emergence of VRE strains is considered a major public health concern. Besides increased morbidity and mortality of VRE infections, increased length of hospitalization and financial burden have also been reported [3].

The resistance to vancomycin in enterococci is mainly mediated by *van* gene phenotypes such as *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, and *vanE* genes, etc. The *vanA* and *vanB* have the highest clinical importance in enterococci among vancomycin-resistant phenotypes [4]. The spread of multi-drug-resistant enterococci strains and resistance-related genes has serious health implications. Furthermore, treatment options for VRE infections are quite limited including linezolid, teicoplanin, and fosfomycin [3]. Moreover, various virulence determinants associated with pathogenesis such as aggregation substance (*Asa1*), enterococcal surface protein (*Esp*), cytolysin (*CylA*), collagen binding protein (*ace*), and gelatinase (*gelE*) are important for the progress of infection among these strains [5].

In Pakistan, the VRE is posing a challenge for clinicians as well as for hospital infection control practitioners. Despite its increased prevalence, data are scarce regarding its detailed characterization from Pakistan. The aim of the current study was

to evaluate the frequency of enterococcal infections, antibiotic resistance profile, detection of antimicrobial resistance and virulence-related genes in clinical strains of enterococcus isolated from tertiary care hospital in the northwest of Pakistan.

Materials and methods

Bacterial isolates. A total of one hundred and fifty ($n = 150$) non-repetitive enterococcal isolates were collected from various clinical specimens of patients admitted at a tertiary care teaching Hospital in Peshawar, Pakistan from January 2020 to February 2021. The isolates were re-identified at the Department of Medical Lab Technology, The University of Haripur by routine microbiological techniques [6]. The Polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers *ddl E. faecium* and *ddl E. faecalis* to confirm the identity of *E. faecium* and *E. faecalis* as described elsewhere [7]. Ethical approval was obtained from the departmental ethical committee at the University of Haripur.

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility was carried out using the Kirby Bauer disc diffusion method according to the guidelines of the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2020) [8]. The antibiotic discs were obtained from (Oxide, England). The antibiotic discs and concentrations used were as follows; Vancomycin (30 µg), Linezolid (30 µg), Teicoplanin (30 µg), Gentamicin (10 µg), Penicillin (10 µg), Amoxicillin (10 µg), Doxycycline (30 µg), Minocycline (30 µg), Ciprofloxacin (30 µg), Levofloxacin (30 µg), Norfloxacin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Fosfomycine (50 µg), Chloramphenicol (30 µg), Nitrofurantoin (300 µg), Rifampicin (5 µg) and Ampicillin (10 µg). The interpretation of the zone of inhibition was performed as per CLSI guidelines [8].

Determination of Vancomycin Minimum inhibitory concentrations (MICs). The enterococcal isolates resistant to vancomycin by disc diffusion method were further tested for minimum inhibitory concentrations. The MICs of vancomycin were determined by E-test using commercially available strips (MTS, Liofilchem, Italy). The interpretation of vancomycin MICs was carried out according to CLSI guidelines. The reference strains *E. faecium*, (ATCC 19434) and *E. faecalis*, (ATCC 19433) were used as control strains [8].

Detection of antimicrobial resistance and virulence related genes. Enterococcal genomic DNA was extracted from overnight culture by boiling method [9]. The vancomycin resistance associated genes *vanA*, *vanB*, and *vanD* and virulence related genes (*esp*, *ace*, *asa1*, *gelE*, and *cylA*) among *E. faecium* and *E. faecalis* were detected by using a series of PCR reactions as described earlier [10, 11].

Statistical analysis. The descriptive variables were expressed in percentages and frequencies. A Pearson test was used for correlation among the variables. The statistical analysis was done by SPSS (version 22) and a p-value of < 0.05 was considered statistically significant. Individual antibiotics sensitivity vs resistance percentages were cross tabulated among *E. faecalis* and *E. faecium* and the Odds ratio (OR) were determined.

Results

Characteristics of the study participant. During the study period, 62.6% (n = 94) *E. faecalis*, 33.4% (n = 50) *E. faecium*, and 4% (n = 6) of other species were isolated. The distribution of the isolated strains from different specimens is shown in Table 1. The patient population of the isolated strains was 42.6% (n = 64) community-acquired whereas 57.4% (n = 86) were hospitalized. The majority, 56% (n = 84/150) of the isolates were recovered from patients who were > 50 years old and 58% (n = 49/84) of them were inpatients. Interestingly 6% (n = 9/150) of the total isolates were recovered from children (< 1 year) and 66.6% (n = 6/9) of them were inpatients.

Antimicrobial susceptibility. Antibiotic susceptibility was carried out and the predominant isolated strain *E. faecalis* showed the highest level of resistance, 95.7% (n = 90/94) to erythromycin, followed by ciprofloxacin 84% (n = 79/94), amoxicillin 66% (n = 62/94) and vancomycin 17% (n = 16/94). Low percentages of resistance were observed against linezolid as shown in Table 2. Among *E. faecium* isolates the resistance against erythromycin was 90% (n = 45/50), followed by ciprofloxacin and gentamicin 80% (n = 40/50 each), levofloxacin 76% (38/50), vancomycin and linezolid 16% (n = 8/50)

Table 1. Distribution of isolated VRE and VSE strains among different specimens

Type of specimens, % (n)	VSE (n = 126), % (n)	VRE (n = 24), % (n)	* χ^2	p value
Urine 52.7 (79)	53.2 (67)	50 (12)	0.059	0.000
Blood 28.7 (43)	28.6 (36)	29.2 (7)	0.013	0.00
Pus & Pus swab 10 (15)	9.5 (12)	12.5 (3)	0.178	0.010
Ascitic fluid 8 (12)	7.9 (10)	8.3 (2)	0.003	0.072
Tracheal secretions 0.6 (1)	0.8 (1)	Nil	0.19	0.207

Note. VSE: Vancomycin sensitive Enterococci, VRE: Vancomycin resistant Enterococci, %: percentage, n = number; * χ^2 : The chi square was used to check the distribution of VRE and VSE among clinical specimens.

Table 2. Antimicrobial resistance among Enterococcus isolates, % (n)

Antibiotics	<i>E. faecalis</i> (n = 94)	<i>E. faecium</i> (n = 50)	p value	OR value	Other Enterococcus species (n = 6)	Total (n = 150)
Penicillin	59.5 (56)	68 (34)	0.041	0.889	66.6 (4)	62.6 (94)
Ampicillin	57.4 (54)	56 (28)	0.048	1.333	66.6 (4)	57.3 (86)
Amoxicillin	66 (62)	58 (29)	0.014	1.472	33.3 (2)	62 (93)
Ciprofloxacin	84 (79)	80 (40)	0.042	1.28	83.3 (5)	82.6 (124)
Levofloxacin	68 (64)	76 (38)	0.037	0.726	50 (3)	70 (105)
Norfloxacin	55.3 (52)	58 (29)	0.047	0.965	66.6 (4)	43.8 (85)
Gentamicin	70 (66)	80 (40)	0.028	0.597	83.3 (5)	74 (111)
Minocycline	32 (30)	22 (11)	0.027	1.712	16.6 (1)	28 (42)
Doxycycline	29.7 (28)	24 (12)	0.04	1.193	16.6 (1)	27.3 (41)
Erythromycin	95.7 (90)	90 (45)	0.022	2.61	100 (6)	94 (141)
Teicoplanin	27.6 (26)	22 (11)	0.001	1.414	16.6 (1)	25.3 (38)
Rifampicin	61.7 (58)	66 (33)	0.038	0.968	33.3 (2)	62 (93)
Nitrofurantoin	42.5 (40)	34 (17)	0.039	1.572	33.3 (2)	39.3 (59)
Chloramphenicol	45.7 (43)	38 (19)	0.018	1.322	16.6 (1)	42 (63)
Fosfomycine	29 (27)	30 (15)	0.049	0.937	50 (3)	30 (45)
Vancomycin	17 (16)	16 (8)	0.024	1.023	0 (0)	16 (24)
Linezolid	3.1 (3)	4 (2)	0.05	0.757	0 (0)	2.5 (5)

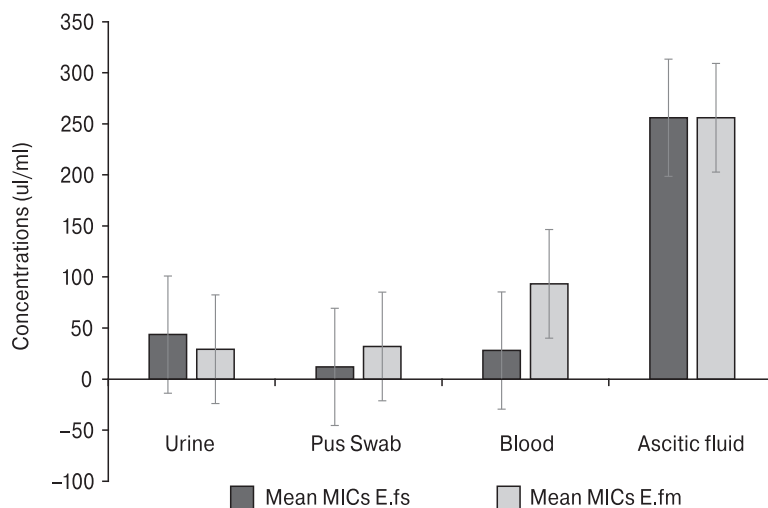


Figure 1. Mean distribution of MICs of *E. faecalis* (E.fs) and *E. faecium* (E.fm) among various clinical specimens of patients attending a tertiary care hospital in Peshawar, Pakistan from January 2020 to February 2021

and 4% (n = 2/50) respectively. Other species of enterococcus (other than *E. faecium* & *E. faecalis*) were resistant to erythromycin 100% (n = 6/6), followed by ciprofloxacin and gentamicin 83.3% (n = 5/6) each. No resistance was observed among other species against vancomycin and linezolid as shown in Table 2.

Vancomycin Minimum Inhibitory Concentrations. Sixteen percent (n = 24) of the isolates (*E. faecium* and *E. faecalis*) were vancomycin-resistant. Whereas no vancomycin resistance was observed against other enterococcus species. The MIC values for vancomycin against *E. faecium* and *E. faecalis* remained higher and fell in the range of 32 µg/ml to 256 µg/ml as shown in Supplementary Table 1. Overall, the difference in vancomycin MIC values among *E. faecium* and *E. faecalis* was statistically not significant (p = 0.624). The mean distribution of MICs of *E. faecium* and *E. faecalis* is shown in Figure 1.

Vancomycin-resistant phenotypes and virulence determinants. The percentages of vancomycin-resistant

phenotypes among *E. faecium* vs *E. faecalis* were as follows: *vanA*; 50% (n = 4) vs 19% (n = 3), *vanB*; 12.5% (n = 1) vs 62.5% (n = 10) and *vanD*; 75% (n = 6) vs not detected. Overall MICs for *vanA*, *vanB*, and *vanD* positive isolates remained above 16 µg/ml (Supplementary Table 1).

A total of five different virulence factors were scrutinized among twenty-four VRE isolates. The prevalence of the virulence factors among *E. faecium* and *E. faecalis* is shown in Table 3. Overall no significant differences have been observed between *E. faecium* and *E. faecalis* virulence genes prevalence.

Multi-drug resistant Enterococci. The highest percentage, 96% (n = 144/150) of the enterococcus isolates had multi-drug resistant patterns. Overall, 94.4% (n = 136/144) of the isolates were resistant to > 5 tested antibiotics and 26.3% (n = 38/144) were resistant to > 10 tested antibiotics and mainly were penicillin, cephalosporin, monobactam, quinolone and aminoglycosides as shown in Supplementary Table 1.

Table 3. Correlation of virulence gene and resistant phenotype among VRE isolated from urine, blood, pus and pus swab and ascitic fluid

Virulence Genes, % (n)	Urine (n = 12)		Blood (n = 7)		Pus (n = 3)		Ascitic fluid (n = 2)		Total (n = 24)
	<i>E. faecalis</i> (n = 9)	<i>E. faecium</i> (n = 3)	<i>E. faecalis</i> (n = 4)	<i>E. faecium</i> (n = 3)	<i>E. faecalis</i> (n = 2)	<i>E. faecium</i> (n = 1)	<i>E. faecalis</i> (n = 1)	<i>E. faecium</i> (n = 1)	
<i>esp</i>	11.1 (1)	33.3 (1)	0 (0)	66.6 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16.6 (4)
<i>ace</i>	33.3 (3)	33.3 (1)	75 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	33.3 (8)
<i>asa1</i>	88.8 (8)	33.3 (1)	100 (4)	33.3 (1)	100 (2)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	70.8 (17)
<i>gelE</i>	33.3 (3)	0 (0)	0 (0)	66.6 (2)	50 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25 (6)
<i>cyIA</i>	11.1 (1)	33.3 (1)	25 (1)	33.3 (1)	100 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25 (6)
Resistant Phenotype, % (n)									
<i>vanA</i>	33.3 (3)	33.3 (1)	0 (0)	66.6 (2)	50 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	29.2 (7)
<i>vanB</i>	44.4 (4)	33.3 (1)	75 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	37.5 (9)
<i>vanD</i>	11.1 (1)	66.6 (2)	0 (0)	66.6 (2)	50 (1)	100 (1)	0 (0)	100 (1)	33.3 (8)

Discussion

The current study was carried out to investigate the growing importance of multi-drug-resistant enterococcal infections in a tertiary care hospital in Peshawar, Khyber Pakyhtunkhwa (KP), Pakistan.

The available collected clinical information confirmed the established risk factors for the acquisition of various enterococcal infections such as hospitalization, advanced age, and neonates which are parallel to the other reports [12, 13]. In our study majority of the enterococcal infections were observed in the ages above 50 years which is similar to the other reported studies [12, 13]. In the current study, the predominant species is *E. faecalis*. The same pattern has been observed among clinical isolates from other studies [11, 14]. It has been reported that majority of the enterococcal infections are caused by *E. faecalis* as compared to other enterococcal species. Furthermore, it has been reported that *E. faecalis* carries more virulence factors in comparison to other Enterococcal species; resulting in its higher pathogenicity [10].

Over the time, the bacteria acquired resistance to anti-enterococcal antibiotics such as glycopeptides, ampicillin, and aminoglycosides. This might contribute to the increased prevalence of *E. faecalis* infections. However, recently certain studies have reported a relative shift in favor of *E. faecium* [2, 12, 15]. In our study high level of resistance to *E. faecalis* has been observed against erythromycin, ciprofloxacin, gentamicin, and ampicillin which is in accordance with the previous studies [16, 17]. The high level of resistance to enterococcal strains against gentamicin is a major concern as this might limit the option of combination therapy (Cell wall inhibitor antibiotics like ampicillin or vancomycin plus aminoglycosides such as gentamicin) which could be considered essential for the treatment of severe infections. Linezolid which was available for the first time in the year 2000 has been considered an alternate drug of choice for treating VRE infection. This is active against both *E. faecalis* and *E. faecium* [16]. In our study, the resistance of linezolid against *E. faecium* and *E. faecalis* was 4% and 3.1% respectively.

Surprisingly, in the current study, 96% of the enterococcus isolates were multi-drug resistant which is parallel with the previous report from Iran [18]. In our country, the treatment for the infections associated with MDR enterococci is complicated due to extensive misuse of antibiotics. Furthermore, the acquisition of antimicrobial resistance and its dissemination through plasmid and conjugative transposons play an important role in the progression of MDR enterococci [18].

The prevalence of VRE in the current study was 16% which is slightly raised from the results reported from Germany, Iran, and Italy; 11.2%, 9.4%, and 9% respectively [19]. However, the prevalence of VRE varies in different regions and a high frequency of VRE has been reported in the UK: (14.5%), Saudi Arabia:

(17.3%), and Turkey: (80.2%) (14, 20, 21). The MICs of vancomycin in the majority cases for both *E. faecium* and *E. faecalis* fell in the range of 32 µg/ml to 256 µg/ml. The emergence of VRE in enterococci is considered one of the influential factor of enterococcal nosocomial infections [10]. The increased prevalence of VRE in Pakistan is a serious concern, especially for the treatment of multi-drug resistant Gram-positive infections.

In the current study, we observed various percentages of *vanA*, *vanB*, and *vanD* phenotypes among VRE isolates. A study conducted in Iran reported that all VRE isolates were *vanA* phenotype [22]. One possible explanation for this variation might be the presence of other resistance genes such as *vanB* and *vanD* in the current study and the presence of other resistance mechanisms including thick cell wall production etc. However, some studies have reported variations in *van* phenotypes which are following our findings [2, 19, 23].

The observed prevalence of the *ace* gene among *E. faecalis* and *E. faecium* were 44% and 12.5% respectively. In other studies, the reported prevalence of *ace* was 42% and 39% respectively [11, 24]. Previously, it was hypothesized that *ace* gene products facilitate bacterial binding to the root dentin canal. Furthermore, they found out a significant correlation between the intact gene presence and subsequent attachment to dentin by *E. faecalis* [25]. Thus the presence of the *ace* gene in enterococcus species might be considered as an important virulence factor [11, 25]. Moreover, the frequency of *gelE* gene (25%) almost remained the same in both species. Gelatinase is a zinc metalloprotease with hydrolytic ability [16]. The observed frequency is slightly higher from the previous report which was 16% [26]. The percentages of *cylA*, *asaI*, and *esp* genes among *E. faecalis* and *E. faecium* were 12.5% vs 25%, 94% vs 25%, and 6% vs 37.5% respectively. Previously no *cylA* gene was detected in any isolates of *E. faecium* and low prevalence of *asaI* (2%) and *esp* (17.5%) were reported [2, 27]. Other studies reported a high frequency of *esp* gene among clinical isolates of vancomycin resistant *E. faecium* in comparison to fecal isolates. This increased prevalence of the *esp* gene in clinical isolates might indicate its role in enterococcal pathogenesis [2, 28]. The *asaI* gene-encoded aggregation substances facilitate binding to the host epithelium and during conjugation mediate bacterial aggregation and participate in plasmid exchange [16].

Conclusively, our study reported that *E. faecalis* was most prevalent among other enterococcus species. The majority of the isolates were multi-drug resistant and the highest percentages of resistance were observed against erythromycin, ampicillin, aminoglycosides, and vancomycin. The VRE isolates carried antimicrobial resistance and virulence-related genes and the most common glycopeptides-resistant phenotypes were *vanA*, *B*, *D* among VRE enterococcus isolates. Furthermore, due to this increased prevalence of MDR enterococci in clinical isolates, appro-

appropriate control measures and surveillance are essential to control the transmission and emergence of these isolates in hospitals.

Additional information

Author contributions. This study was designed and supervised by Ihsan Ali and Abdul Jabbar. Jamshid

Ullah, Atif Aziz, Inam Ullah, Muhammad Umair, Aman Ullah and Hanif Ullah carried out bench work and assembled the data. Matiullah, Mutiullah, Abdul Jabbar and Ihsan Ali performed analysis, interpretation and drafted the manuscript. The final manuscript were read and approved by all authors.

Supplementary materials are available at: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ARP-17642>

References

- Ahmed M.O., Baptiste K.E. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microb. Drug Resist.*, 2018, vol. 24, no. 5, pp. 590–606. doi: 10.1089/mdr.2017.0147
- Alotaibi F.E., Bukhari E.E. Emergence of Vancomycin-resistant Enterococci at a Teaching Hospital, Saudi Arabia. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2017, vol. 130, no. 3, pp. 340–346. doi: 10.4103/0366-6999.198923
- Arshadi M., Mahmoudi M., Motahar M.S., Soltani S., Pourmand M.R. Virulence determinants and antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from different sources in Southwest Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 2018, vol. 47, no. 2: 264.
- Biswas P.P., Dey S., Sen A., Adhikari L. Molecular Characterization of Virulence Genes in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Sensitive Enterococci. *J. Glob. Infect. Dis.*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 16–24. doi: 10.4103/0974-777X.176141
- Brown D.F., Hope R., Livermore D.M., Brick G., Broughton K., George R.C., Reynolds R.; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among enterococci and non-pneumococcal streptococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, vol. 62, suppl. 2: ii75–85. doi: 10.1093/jac/dkn354
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. USA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2020. 332 p.
- Emaneni M., Hosseinkhani F., Jabalameli F., Nasiri M.J., Dadashi M., Pouriran R., Beigverdi R. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococcus in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, vol. 35, no. 9, pp. 1387–1392. doi: 10.1007/s10096-016-2702-0
- Emaneni M., Aligholi M., Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Pol. J. Microbiol.*, 2008, vol. 57, no. 2, pp. 173–178.
- Facklam R.R., Collins M.D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, vol. 27, no. 4, pp. 731–734. doi: 10.1128/jcm.27.4.731-734.1989
- Fath E.B., Bonakdar H.F., Eyni M., Ali G.M., Nakhjavani F.A., Kazemi B. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. 2006. *DARU*, 2006, vol. 14, no. 3, pp. 141–145.
- Ghaziasgar F.S., Poursina F., Hassanzadeh A. Virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance pattern in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical and commensal human samples in Isfahan, Iran. *Ann. Ig.*, 2019, vol. 31, no. 2, pp. 154–164. doi: 10.7416/ai.2019.2268
- Haghi F., Lohrasbi V., Zeighami H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in enterococci isolated from hospitalized patients in Northwest Iran. *BMC Infect. Dis.*, 2019, vol. 19, no. 1: 744. doi: 10.1186/s12879-019-4395-3
- Heidari H., Emaneni M., Dabiri H., Jabalameli F. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients. *Microb. Pathog.*, 2016, vol. 90, pp. 93–97. doi: 10.1016/j.micpath.2015.11.017
- Hubble T.S., Hatton J.F., Nallapareddy S.R., Murray B.E., Gillespie M.J. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2003, vol. 18, no. 2, pp. 121–126. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00059.x
- Jahansepar A., Ahangarzadeh Rezaee M., Hasani A., Sharifi Y., Rahnamaye Farzami M., Dolatyar A., Aghazadeh M. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran. *Microb. Drug Resist.*, 2018, vol. 24, no. 8, pp. 1165–1173. doi: 10.1089/mdr.2017.0380
- Kafil H.S., Asgharzadeh M. Vancomycin-resistant enterococcus faecium and enterococcus faecalis isolated from education hospital of Iran. *Maedica (Bucur)*, 2014, vol. 9, no. 4, pp. 323–327.
- Kariyama R., Mitsuhata R., Chow J.W., Clewell D.B., Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 8, pp. 3092–3095. doi: 10.1128/JCM.38.8.3092-3095.2000
- López-Salas P., Llaca-Díaz J., Morfin-Otero R., Tinoco J.C., Rodríguez-Noriega E., Salcido-Gutierrez L., González G.M., Mendoza-Olazarán S., Garza-González E. Virulence and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* clinical isolates recovered from three states of Mexico. Detection of linezolid resistance. *Arch. Med. Res.*, 2013, vol. 44, no. 6, pp. 422–428. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.07.003
- Pinholt M., Ostergaard C., Arpi M., Bruun N.E., Schönheyder H.C., Gradel K.O., Søgaard M., Knudsen J.D.; Danish Collaborative Bacteraemia Network (DACOBAN). Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006–2009: a population-based cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 145–151. doi: 10.1111/1469-0691.12236
- Reyes K., Bardossy A.C., Zervos M. Vancomycin-Resistant Enterococci: Epidemiology, Infection Prevention, and Control. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2016, vol. 30, no. 4, pp. 953–965. doi: 10.1016/j.idc.2016.07.009

21. Sattari-Maraji A., Jabalameli F., Node Farahani N., Beigverdi R., Emaneini M. Antimicrobial resistance pattern, virulence determinants and molecular analysis of *Enterococcus faecium* isolated from children infections in Iran. *BMC Microbiol.*, 2019, vol. 19, no. 1: 156. doi: 10.1186/s12866-019-1539-y
22. Shokoohzadeh L., Ekrami A., Labibzadeh M., Ali L., Alavi S.M. Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients. *BMC Res. Notes*, 2018, vol. 11, no. 1: 1. doi: 10.1186/s13104-017-3088-5
23. Shokouhi S., Darazam I.A., Javadi A., Rouhani M., Ghasemnejad M. Genotypic Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. In Tertiary Center, Iran. *Infect. Disord. Drug. Targets*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 90–94. doi: 10.2174/1871526517666170210164649
24. Wardal E., Kuch A., Gawryszewska I., Żabicka D., Hryniewicz W., Sadowy E. Diversity of plasmids and Tn1546-type transposons among VanA *Enterococcus faecium* in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2017, vol. 36, no. 2, pp. 313–328. doi: 10.1007/s10096-016-2804-8
25. Yang J.X., Li T., Ning Y.Z., Shao D.H., Liu J., Wang S.Q., Liang G.W. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: a hospital-based study in Beijing, China. *Infect Genet. Evol.*, 2015, vol. 33, pp. 253–260. doi: 10.1016/j.meegid.2015.05.012
26. Yu J., Shi J., Zhao R., Han Q., Qian X., Gu G., Zhang X., Xu J. Molecular Characterization and Resistant Spectrum of Enterococci Isolated from a Haematology Unit in China. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2015, vol. 9, no. 6: DC04-7. doi: 10.7860/JCDR/2015/12864.6097
27. Zhang Y., Du M., Chang Y., Chen L.A., Zhang Q. Incidence, clinical characteristics, and outcomes of nosocomial *Enterococcus* spp. bloodstream infections in a tertiary-care hospital in Beijing, China: a four-year retrospective study. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2017, vol. 6: 73. doi: 10.1186/s13756-017-0231-y
28. Zhou W., Zhou H., Sun Y., Gao S., Zhang Y., Cao X., Zhang Z., Shen H., Zhang C. Characterization of clinical enterococci isolates, focusing on the vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in China: based on the data from 2013 to 2018. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1, pp. 1–9.

Авторы:

Улла Д., магистр философии, преподаватель, кафедра медицинских лабораторных технологий, факультет фундаментальных и прикладных наук, Университет Харипура, КПК, Пакистан;

Азиз А., магистр философии, преподаватель, кафедра медицинских лабораторных технологий, факультет фундаментальных и прикладных наук, Университет Харипура, КПК, Пакистан;

Улла А., магистр философии, преподаватель, кафедра медицинских лабораторных технологий, факультет фундаментальных и прикладных наук, Университет Харипура, КПК, Пакистан

Улла И., магистр философии, преподаватель, кафедра медицинских лабораторных технологий, факультет фундаментальных и прикладных наук, Университет Харипура, КПК, Пакистан;

Джаббар А., ассистент, кафедра медицинских лабораторных технологий, факультет фундаментальных и прикладных наук, Университет Харипура, КПК, Пакистан;

Умейр М., магистр философии, преподаватель, Институт парамедицинских наук (IPMS), Хайберский медицинский университет, Пешавар, КПК, Пакистан;

Улла Мути, ассистент, Институт патологии и диагностической медицины (IPDM), Хайберский медицинский университет, Пешавар, КПК, Пакистан;

Улла Х., магистр философии, преподаватель, Группа Сайду клинической больницы, Сайду-Шариф, Сват, КПК, Пакистан;

Улла Мати, магистр философии, преподаватель, Институт парамедицинских наук (IPMS), Хайберский медицинский университет, Пешавар, КПК, Пакистан.

Али И., доцент кафедры медицинских лабораторных технологий, Институт парамедицинских наук (IPMS), Хайберский медицинский университет, Пешавар, КПК, Пакистан.

Authors:

Ullah J., MPhil Scholar, Department of Medical Laboratory Technology, Faculty of Basic & Applied Sciences, The University of Haripur, KPK, Pakistan;

Aziz A., MPhil Lecturer, Department of Medical Laboratory Technology, Faculty of Basic & Applied Sciences, The University of Haripur, KPK, Pakistan;

Ullah A., MPhil Scholar, Department of Medical Laboratory Technology, Faculty of Basic & Applied Sciences, The University of Haripur, KPK, Pakistan;

Ullah I., MPhil Scholar, Department of Medical Laboratory Technology, Faculty of Basic & Applied Sciences, The University of Haripur, KPK, Pakistan;

Jabbar A., Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Technology, Faculty of Basic & Applied Sciences, The University of Haripur, KPK, Pakistan;

Umair M., MPhil Scholar, Institute of Paramedical Sciences (IPMS), Khyber Medical University, Peshawar, KPK, Pakistan;

Ullah Muti, Assistant Professor, Institute of Pathology and Diagnostic Medicine (IPDM), Khyber Medical University, Peshawar, KPK, Pakistan;

Ullah H., MBBS, Trainee Medical Officer, Saidu Group of Teaching Hospitals Saidu Sharif, Swat, Pakistan;

Ullah Mati, MPhil Lecturer, Institute of Paramedical Sciences (IPMS), Khyber Medical University, Peshawar, KPK, Pakistan.

Ali I., Assistant Professor in the Department of Medical Laboratory Technology, Institute of Paramedical Sciences (IPMS), Khyber Medical University, Peshawar, KP, Pakistan.

Поступила в редакцию 04.05.2024
Отправлена на доработку 15.06.2024
Принята к печати 28.07.2024

Received 04.05.2024
Revision received 15.06.2024
Accepted 28.07.2024

BIOSYNTHESIS OF NOVEL MnO₂ NANOCAPSULES VIA *C. SPINOSA* EXTRACT AND HONEYBEE-DERIVED CHITOSAN: EXPLORING ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER PROPERTIES

M.G. Elharrif^a, N.A. Hassan^b, M. Sharaf^{c,d}

^a Shaqra University, Shaqra, Saudi Arabia

^b Chemical Industries Research Institute, National Research Centre, Cairo, Egypt

^c AL-Azhar University, Nasr City, Cairo, Egypt

^d Ocean University of China, Qingdao, PR China

Abstract. This investigation delves into the integration of *Capparis spinosa* extract (CSLe) onto manganese dioxide nanoparticles (MnO₂NPs) and chitosan derived from honeybees (CSH) in a nanostructured configuration. The resultant nanocomposites, namely CSLe@MnO₂NPs and CSH/CSLe@MnO₂NPs, underwent thorough characterization through various analytical techniques. UV-Vis spectroscopy unveiled distinctive features, such as ligand-to-metal charge transfer and photoluminescence, affirming the successful chitosan-functionalization of the MnO₂NPs, thereby differentiating them from their pristine counterparts. FTIR spectra corroborated the binding of chitosan and identified crucial molecular functional groups. SEM-EDX analysis revealed the morphological properties, addressing non-uniform sizes in the as-calcined MnO₂NPs by the uniform coating of CSH on CSLe@MnO₂NPs, while EDX confirmed the presence of essential elements. TEM and SAED provided insights into the spherical morphology, crystalline structure, and lattice planes of these nanoparticles. Size distribution measurements highlighted distinctions between CSLe@MnO₂NPs and CSH/CSLe@MnO₂NPs. The nanomaterials underwent evaluation for their antimicrobial properties against a spectrum of Gram-negative and Gram-positive bacterial strains, with CSH/CSLe@MnO₂NPs exhibiting the highest bactericidal activity. Additionally, they demonstrated low minimum inhibitory concentration (MIC) values, especially against *S. aureus* (MIC as low as 12.5 µg/ml). Their efficacy extended to anti-biofilm formation, significantly diminishing biofilm development in a dose-dependent manner, a pivotal factor in addressing biofilm-related infections. The study also scrutinized their cytotoxicity against normal Vero and PC3 prostate cancer cells, revealing potential anticancer properties. Dose-dependent reductions in cell viability were observed for both normal and cancer cells. In conclusion, these findings underscore the versatility and promise of CSH/CSLe@MnO₂NPs in diverse biomedical applications, including antibacterial, anti-biofilm, and anticancer therapies.

Key words: *C. spinosa*, MnO₂NPs, honeybees chitosan, antibacterial, anti-biofilm, anticancer.

Адрес для переписки:

Мохаммед Гамаль Эльхарриф
11961, Саудовская Аравия, г. Шахра, факультет
фундаментальных медицинских наук, Медицинский колледж,
Университет Шахра.
Тел.: +96656364746.
E-mail: al_harrif@yahoo.com

Contacts:

Mohamed Gamal Elharrif
11961, Saudi Arabia, Shaqra, Department of Basic Medical
Sciences, College of Medicine, Shaqra University.
Phone: +96656364746.
E-mail: al_harrif@yahoo.com

Для цитирования:

Эльхарриф М.Г., Хасан Н.А., Шараф М. Биосинтез новых нанокapsул MnO₂ с помощью экстракта *C. spinosa* и хитозана медоносной пчелы: изучение антибактериальных и противораковых свойств // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 1002–1016. doi: 10.15789/2220-7619-BON-17582

Citation:

Elharrif M.G., Hassan N.A., Sharaf M. Biosynthesis of novel MnO₂ nanocapsules via *C. spinosa* extract and honeybee-derived chitosan: exploring antibacterial and anticancer properties // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 1002–1016. doi: 10.15789/2220-7619-BON-17582

БИОСИНТЕЗ НОВЫХ НАНОКАПСУЛ MnO₂ С ПОМОЩЬЮ ЭКСТРАКТА *C. SPINOSA* И ХИТОЗАНА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ: ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОРАКОВЫХ СВОЙСТВ

Эльхарриф М.Г.¹, Хасан Н.А.², Шараф М.^{3,4}

¹ Университет Шакра, Шакра, Саудовская Аравия

² Научно-исследовательский институт химической промышленности, Национальный исследовательский центр, Каир, Египет

³ Университет Аль-Азхар, Наср-Сити, Каир, Египет

⁴ Океанский университет Китая, Циндао, Китай

Резюме. Настоящее исследование посвящено описанию нанесения экстракта *Capparis spinosa* (CSLE) на наночастицы диоксида марганца (MnO₂NP) и хитозан медоносных пчел (CSH) в наноструктурированной конфигурации. Полученные наноконпозиции, а именно CSLE@MnO₂NPS и CSH/CSLE@MnO₂NPS, были тщательно охарактеризованы с помощью различных аналитических методов. Спектроскопия в УФ- и видимой области обнаружила отличительные особенности, такие как перенос заряда «лиганд–металл» и фотолуминесценцию, подтверждая успешную функционализацию хитозана на MnO₂NP, тем самым дифференцируя их от соответствующих интактных аналогов. Спектры инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС) подтвердили связывание хитозана и идентифицировали ключевые молекулярные функциональные группы. Анализ с помощью способа линейного сканирования SEM-EDX выявил морфологические свойства, касающиеся неравномерных размеров кальцинированных MnO₂NP с помощью равномерного покрытия CSH на CSLE@MnO₂NP, в то время как энергодисперсионный рентгеноспектральный микроанализ (EDX) подтвердил наличие необходимых элементов. Просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ) и электронная дифракция на отдельных участках (SAED) дали представление о сферической морфологии, кристаллической структуре и кристаллической плоскости таких наночастиц. Измерения распределения по размерам выявили различия между CSLe@MnO₂NPs и CSH/CSLe@MnO₂NPs. Наноматериалы прошли оценку на антимикробные свойства в отношении различных грамотрицательных и грамположительных бактериальных штаммов, с максимальной бактерицидной активностью у CSH/CSLe@MnO₂NPs. Кроме того, минимальная ингибирующая концентрация (МИС), особенно против *S. aureus* (МИС не более 12,5 мкг/мл) описана при низких значениях. Их эффективность также распространялась на формирование антибиопленки, достоверно дозозависимо снижая образование биопленки как ключевого фактора в отношении инфекций, связанных с биопленкой. Также тщательно изучена цитотоксичность соединений в отношении нормальных клеток Vero и клеток рака предстательной железы PC3, выявившая дозозависимое снижение жизнеспособности клеток обеих линий. Полученные результаты подчеркивают универсальность и перспективность CSH/CSLE@MnO₂NP при использовании в различных биомедицинских целях, включая антибактериальное действие, подавление синтеза антибиопленки и противоопухолевую терапию.

Ключевые слова: *C. spinosa*, MnO₂NP, хитозан медоносной пчелы, антибактериальные, антибиопленка, противораковые.

Introduction

Nanotechnology has significantly transformed the medical landscape, providing innovative solutions to a myriad of healthcare challenges. Manganese dioxide nanoparticles (MnO₂NPs) have garnered substantial attention owing to their unique properties and promising applications in medicine [41]. MnO₂NPs, acting as carriers for therapeutic drugs, facilitate targeted drug delivery to specific cells or tissues, thereby minimizing side effects and amplifying the therapeutic efficacy of medications. The functionalization of MnO₂NPs allows for controlled drug release at the desired location, making them indispensable for personalized medicine and improved treatment outcomes [72].

In the context of healthcare, MnO₂NPs possess diverse pharmacological properties that render them invaluable for medical applications. These properties encompass antioxidant, antimicrobial,

neuroprotective, anticancer, and wound-healing attributes. The multifaceted pharmacological profile of MnO₂NPs positions them as promising agents in disease treatment and healthcare, playing a pivotal role in reshaping medical treatments, offering innovative solutions across a spectrum of diseases, and enhancing patient outcomes [57, 66].

Chitosan, a biopolymer derived from chitin found in the shells of crustaceans like shrimp and crabs, is a remarkably versatile material. Particularly intriguing is its utilization when sourced from honeybee exoskeletons in a nanostructured form, a relatively novel and less-explored avenue [2]. Bee-derived chitosan boasts intriguing pharmacological properties with potential applications across various medical and pharmaceutical contexts [33]. It exhibits biocompatibility and biodegradability, making it ideal for drug encapsulation and controlled release, particularly in targeted cancer therapy. Chitosan nanoparticles can target specific tissues or cells, enhance

ing drug absorption while minimizing side effects. Additionally, its antimicrobial properties make it effective against bacteria and fungi, useful in wound healing and medical device coatings. Chitosan's ability to form gels and films also supports tissue engineering and regeneration [60].

Capparis spinosa, commonly known as caper, has been utilized in traditional medicine for centuries due to its rich phytochemical composition and diverse pharmacological properties. Key compounds like quercetin, rutin, catechin, and various flavonoids contribute to its therapeutic potential, offering antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and potentially anti-diabetic benefits. This botanical extract shows promise in managing conditions such as arthritis, inflammatory bowel diseases, and combating microbial infections, while also potentially regulating blood sugar levels [37].

Incorporating *C. spinosa* into nanostructures presents a promising avenue for enhancing its pharmacological properties. Nanostructured drug delivery systems can significantly improve the bioavailability and therapeutic efficacy of its bioactive compounds. By encapsulating phytochemicals in nanoparticles or nanocarriers, these formulations enhance solubility, enable controlled and sustained release, and target specific cells or tissues, thereby optimizing therapeutic impact while minimizing side effects. This modern approach holds potential for making *C. spinosa* more effective and efficient in various therapeutic applications [3].

Furthermore, nanoencapsulation of *C. spinosa*'s bioactive compounds safeguards them from degradation, boosting stability and shelf life, vital for herbal medicine efficacy. Recent studies have effectively encapsulated these compounds into nanostructures like liposomes and nanoparticles, enhancing pharmacokinetic and pharmacodynamic properties [48]. This advancement in nanomedicine offers promising avenues for improving *C. spinosa*'s therapeutic potential, paving the way for enhanced drug development and natural product-based therapies [34].

Precise targeting of therapies remains a challenge despite the potential of nanostructures for targeted drug delivery. Understanding their interaction with specific cells or tissues is essential. Moreover, comprehensive studies on the long-term effects and potential toxicity of these materials are lacking. Ensuring the biocompatibility and biodegradability of nanostructures is crucial for their safe application in medical treatments. Therefore, the primary goal of this study is to assess the antibacterial and anticancer properties of Manganese Dioxide (MnO_2) combined with extracts from the *C. spinosa* plant, incorporated into nanoparticles and mixed with honeybee-derived chitosan. This innovative combination is being investigated as a potential new pharmacologically active compound. Additionally, we aim to identify and characterize the nanoparticles used in this formula-

tion. This research endeavors to shed light on the potential therapeutic applications of these compounds, addressing both their antimicrobial and anticancer effects

Materials and methods

Plant collection and preparation. *C. spinosa*, samples were collected from habitats at northwestern coastal region (Alex-Marsa Matrouh Road, 62 km west of El-Hammam city), at the recorded site 30 44 46.88828°N, 29 12 8.0926°E, the collected samples were identified, authenticated taxonomically by the Herbarium, at Desert Research Center, Cairo, Egypt. *C. spinosa*, samples were washed by distilled water then were shade dried at lab-temperature till constant weight. Then, grounded into fine powdery form, sieved and finally stored in dry glass jar at room temperature for further use.

Extraction of natural molecules of *C. spinosa*, samples. *C. spinosa* were dried at 60°C till a constant dry weight and ground to powder. Then, 10 g of *C. spinosa*, powder was added to a conical flask with a 100 ml capacity, 5 ml of 2% phenol water, and 10 ml of 30% trichloroacetic acid. After shaking the mixture and letting it sit for a whole night, the filtrate was created up to 50 ml [1].

HPLC. *C. spinosa*, sample were subjected to identification of phenolic compounds using HPLC. 10 μ l of the sample was injection and analyzed at flow rate 0.7 mL/min using Agilent 1200 LC-MS-ESI instrument (positive mode) with a diode array detector set at 254, 280, 320 and 520 nm. Agilent Zorbax Eclipse plus C18 column using nitrogen as nebulizing gas was used. Mobil phase used was 1% formic acid (A) and acetonitrile (B); gradient was 0 min 5% B, 1 min 20% B, 6 min 20% B, 8 min 80% B, 18 min 80% B, 19 min 5% B and 20 min 5%. Mass scanned in the range m/e 0–1000 at fragmentation energy 20 eV and potential 4.0 kV [9].

Chitosan bee's extraction. Several phases were involved in the extraction of biopolymers of chitin and chitosan from a novel potential source which dead corniolan honeybees hybrid were collected in front of bee hives during the autumn season 2022 from the commercial apiary located in Motobes region Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. To extract chitin, the protein (deproteination) and mineral (demineralization) elements of subpestilence are first dissolved and removed. The raw honey bee *Apis mellifera* material was first ground using (CM 190 Cemotec™, Denmark). Demineralization was then performed using the Hackman technique with minor modifications [21], by treating the crushed raw material with 2 M hydrochloric acid (ratio, 1:10) for 5 h at 25–27°C. Then, deproteination was accomplished by treating the pulverized raw materials with a 1 N sodium hydroxide solution for 1 h at a temperature of 80–85°C. Then, dried at 60–65°C for 4h.

Preparation of CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs. Co-precipitation and green chemistry methods were used to synthesize MnO₂NPs. To this end, 0.47 g KMnO₄ precursor was dissolved in 20 ml of deionized water. *C. spinosa* extract was then added drop by drop to the previous solution and stirred at 40°C for 2 h using a magnetic stirrer. The resultant solution was dried in an oven at 80°C. The powder obtained was calcined at 400°C for 2 h. For extracted chitosan from dead bees (CHN) solutions was prepared by dissolving 1 g of chitosan in 100 mL of 1.0% aqueous acetic acid and stirring until the liquid became translucent. Then, the CSLe@MnO₂NPs were combined by ionic gelation process with the create bees chitosan. Finally, the suspension was stirred under magnetic stirring at room temperature and left to qualify for 30 min. The bee chitosan NPs were then centrifuged at 3000 rmb for 15 min at 3–5°C and freeze-dried with 10% (m/m) trehalose in a Freeze-dryer for 24 h [5].

Characterization of prepared samples. A PerkinElmer Spectrum 100 Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer (PerkinElmer, MA) with an attenuated total reflection (ATR) accessory of germanium crystal with a high-resolution index (4.0), performing 64 scans for each spectrum at 4 cm⁻¹ resolution, was used to collect the FTIR spectra of CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs samples in the 500–4000 cm⁻¹ range [70]. By applying 10 µl of diluted material to holey carbon films on copper grids, TEM was utilized to examine the shape and distribution of the MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs. The samples were seen functioning at a 200 kV accelerating voltage. ImageJ software, version 1.52a, was used to measure nanoparticle size. SEM with EDX analysis (Tescan Vega3, Czechia) was performed at scale levels of 20 µm, 2 µm, 1 µm and 500 nm with the magnification of 1000×, 10,000× and 50,000×. ImageJ software was applied to calculate crystallite size from 2D SEM images. X-ray diffraction (JEOL JDX-3623, Japan) analysis was performed with CuKα (wavelength = 1.5418 Å) radiation from 2θ values of 10° to 80° with applied current and voltage range of 2.5–30 mA and 20–40 kV, respectively [29].

Bacterial sample collection. All the isolated Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, and *Enterococcus faecalis*, Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Acinetobacter baumannii* were collected from the Microbiology Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Egypt, through the proper protocol and identified and diagnosed based on morphological characteristics and biochemical examinations according to the standard methods of diagnosis and confirmed with the “Vitek 2 compact” [20, 52]

Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) and minimum bactericidal concentration (MBCs). By using the usual dilution approach, a broth micro dilution assay was used to estimate the MIC

of antibacterial activity in 96 multi-well micro titer plates (CLSI M07-A8). 100 µl of TSB (Himedia) were dispersed evenly across all wells. A volume of 100 µl from each CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs (1024 – 2.5 µg mL⁻¹) were pipetted into the wells of the first row of the micro titer plate. Finally, 100 µl of freshly made, 0.5 McFarland matching turbid bacterial solution were put to each well. Each plate contained two columns that served as both positive and negative controls. Wrapped plates were incubated for 18–24 h at 37°C. The plates were visually inspected for the presence or absence of turbidity against a dark background. The MIC was determined as the lowest concentration at which there was no discernible bacterial growth when compared to controls. Additionally, stock inoculum suspensions were made in trek diagnostic systems sterile saline with 1% tween 80 from 7 days colonies on potato dextrose agar slants (provided by Remel, Lenexa, Kans) used to estimate the MIC of antifungal activities. A 95% of the stock inoculum suspensions measured 0.9 × 10⁶ to 4.5 × 10⁶ CFU/mL. On test day, each microdilution well was infected with 100 µl of the diluted (Twofold) conidial inoculum suspensions in liquid potato. Then, 200 µl per well of Dextrose Agar (PDA) and microdilution trays were tested after 4 days at 28°C. The MICs goals were the lowest CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs concentrations that inhibited growth completely (100% inhibition). By sub culturing 20 µl from the clear wells of the MICs and MBCs was ascertained.

Anti-biofilm viability assay. The crystal violet staining test was determined the impact of CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs on biofilm formation by *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *E. coli* [19, 62]. In brief, 20 µl of each isolated bacteria was added overnight to growth. Different concentrations of CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs (1.562 and 25 mg/mL) were added to 180 µL of LB medium with 0.2% (w/v) glucose and incubated at 30°C for 24 h. Then, washing with phosphate buffer pH 7.4 got rid of the planktonic cells, and a 0.1% crystal violet solution was used to color the biofilm that stuck to the surface. After 15 min, sterile-distilled water was used to wash the crystal violet that had been taken apart. Last, the crystal violet that was stuck to the biofilm was released with 200 µl of 95% ethanol. The intensity of the crystal violet at 570 nm was measured with a UV-vis spectrophotometer.

$$\% \text{ Biofilm formation} = (\text{OD control} - \text{OD sample}) / (\text{OD control}) \times 100. \quad (1)$$

Evaluation of cytotoxicity by MTT Assay. Both control CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs conjugates were subjected to cytotoxicity evaluation by MTT assay. For this purpose, Vero

ATCC CCL-81 normal cells and PC3 prostate cancer cell line were used to access the anticancer potential, as reported by [4, 47]. Briefly, Vero ATCC CCL-81 and PC3 cells were grown for 24 h at 37°C in 96-well microtiter plates (pre-inoculated with MnO₂NPs alone, and CSH/CSLe@MnO₂NPs conjugates) using a DMEM that was additionally supplemented with 10% of FBS. After 24 h incubation, the DMEM was removed. The Vero ATCC CCL-81 and PC3 cells were again incubated for 4 h at 37°C in the presence of 20 µL of MTT (5 mg/mL in PBS) supplemented fresh medium. Following that, DMSO (150 µL/well) was used to solubilize the formazan crystals resulting from the mitochondrial reduction of MTT. Finally, the absorbance was recorded at 570 nm (2300 EnSpire Multilabel Plate Reader, Perkin Elmer).

The OD should be directly interrelated to the quantity of cellular activity.

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{OD test} - \text{OD blank}) / (\text{OD control} - \text{OD blank}), \quad (2)$$

where OD optical density, test indicates the cells exposed to the CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs sample, control in term the control sample, and blank in term the wells without Vero ATCC CCL-81/cercopithecus aethiops kidney normal cells and PC3 prostate cancer cell lines.

Statistics analysis. Data was presented as mean ± standard error of mean. GraphPad prism software program (version 7.0 (2016) Inc., San Diego, CA, USA) was applied in statistical analysis. The statistical difference among groups was examined by one-way ANOVA subsequently Post hoc-Tukey's test for comparison between groups. All p values (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001), were regarded as statistically significant [44, 45].

Results

HPLC

The HPLC retention durations of the phytoconstituents were compared to the retention periods of the used reference samples to confirm their identities. Four compounds were found in the aqueous extract of the *C. spinosa* after HPLC analysis. Some identification was on the basis of evaluations against current criteria. The substances that were found all products of nature, two compounds of phenolic acids, one compound of each glycoside, and hydroxybenzoate as shown in Fig 1. 19 chemical compounds were identified and purified using HPLC. The percentages of the detected chemicals were computed and compared to the total peaks in the HPLC chromatogram, showing that naringenin (flavonoid), vanillin(organic compound), chlorogenic acid (polyphenol), daidzein (isoflavone), ferulic acid (polyphenol), and methyl gallate (gallate ester) were the major isolated compounds at a concentration of 22.41%, 14.05%, 13.97%, 9.59%, 9.45% and 5.71% respectively. Furthermore the result showed catechin (flavan-3-ol) at a concentration of 2.72%, gallic acid (phenolic acids) at a concentration of 2.89%, caffeic acid (phenolic acids) at a concentration of 3.40%, quercetin (flavonol) at a concentration of 0.527%, syringic acid (phenolic acids) at a concentration of 0.250%, rutin (flavonoid) at a concentration of 0.0559%, cinnamic acid (organic compound) at a concentration of 0.0584% and hesperetin (flavonoid) at a concentration of 0.0626%.

Characterization of CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs

UV-vis spectroscopic. The UV-visible spectroscopic analysis (Fig. 2A, see cover II) were demonstrated the presence of ligand-to-metal charge transfer from

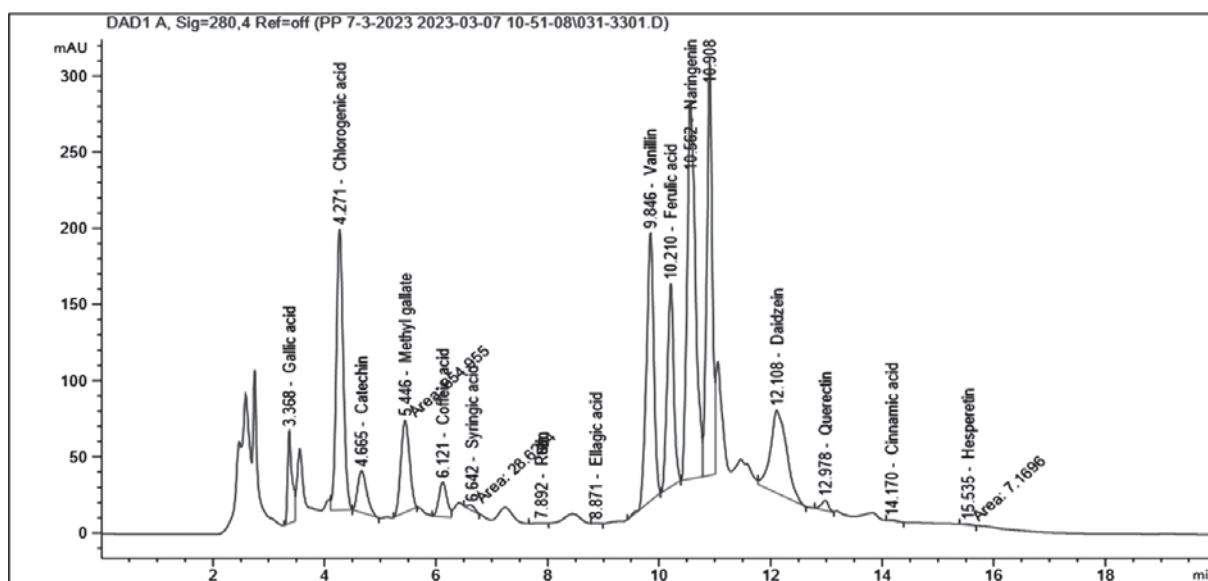


Figure 1. HPLC chromatogram of *C. spinosa* extract

chitosan to Mn²⁺ ions in the MnO₂NPs. Additionally, the room temperature photoluminescence exhibited many distinct characteristics, which are not often seen in unmodified MnO₂NPs. The determination and quantification of the production of chitosan, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs were conducted utilizing the intensity of UV-Vis absorption peaks. Fig. 2A illustrates the presence of a large absorption peak at wavelengths of 350 nm, 245 nm, and 250 nm, respectively.

FTIR spectra. The ligands were generated and the molecules and functional groups were identified by the acquisition of FTIR spectra for the as-calcined MnO₂NPs nanoparticles, CSLe plant, and the composite of MnO₂NPs with Hypericum. The findings are shown in Fig. 2B. The vibrational modes associated with Mn-O-Mn interactions are responsible for the absorption peaks seen within the wavenumber range of 550–650 cm⁻¹. The presence of covalent bonding between the ligand chitosan and the CSLe@MnO₂NPs was verified by the observed alteration in the FTIR spectra, namely in the region associated with the stretching of C-N bonds at a wavenumber of 1210 cm⁻¹. The existence of C-O aromatic carbon compounds is indicated by the absorption peak seen at 1300 cm⁻¹ in the combination of CSLe plant and NPs. Furthermore, the presence of CO-O-CO stretching vibrations may be detected by the emergence of a peak at 1050 cm⁻¹ and surface OH groups at 3330 cm⁻¹ in the CSLe and CSLe@MnO₂NPs, as seen in Fig. 2B.

SEM-EDX. In order to investigate the morphological characteristics of the SCLe@MnO₂NPs, scanning electron microscopy (SEM-EDX) was used. As shown in Fig. 2C, the SEM picture revealed that the SCLe@MnO₂NPs, which were subjected to calcination, exhibited diameters ranging from 22 to 35 nm, as indicated in the inset. The mean size of the NPs is determined to be around 25 nm. It is important to acknowledge that the SCLe@MnO₂NPs exhibit heterogeneity and non-uniformity across various regions as a result of adhesion and agglomeration phenomena. The phenomenon described may be attributed to the process of calcination and subsequent exposure to high temperatures, resulting in the agglomeration of nanoparticles due to their inclination to minimize energy. Fig. 2D displays a scanning electron microscopy (SEM) picture of the composite material consisting of SCLe@MnO₂NPs incorporated with chitosan. The homogenous coating of CSH on the surface of CSLe@MnO₂NPs is evident, indicating the effective attachment of CSH to the composite. This may be attributed to the larger size and less agglomeration of the resultant composite compared to SCLe@MnO₂NPs. In addition, the energy-dispersive X-ray (EDX) spectra of manganese dioxide nanoparticles reveals the presence of oxygen and manganese, with corresponding weight percentages of 40.21% and 60.89%. The provided data illustrates a prominent peak seen at an energy level

of 0.2688 kiloelectron volts (keV), which is indicative of the presence of a manganese-oxygen (Mn-O) bond. The presence of elemental peaks of manganese and oxygen in the data supports the conclusion that the production of CSLe@MnO₂NPs has occurred, as seen in Fig. 2E. The composition of the shown elements includes oxygen (11.82%), carbon (21.39%), gold (12.67%), and manganese (54.12%). The findings presented in this study provide confirmation of the successful production of a nanocomposite material consisting of chitosan on CSLe@MnO₂NPs. The low proportion of manganese concentration in the nanocomposite might likely be attributed to the inclusion of manganese dioxide nanoparticles inside the internal porous structure of the chitosan support, as seen in Fig. 2F.

TEM (HRTEM) images and selected area electron diffraction (SAED). In contrast, Fig. 3 illustrates the TEM images of the as-calcined CSLe@MnO₂NPs and composited CSH/CSLe@MnO₂NPs. The TEM images demonstrate that the CSLe@MnO₂NPs have a shape resembling spheres (Fig. 3A). Furthermore, the TEM examination provides further confirmation of the observed accumulation of CSH/CSLe@MnO₂NPs and the subsequent increase in their dimensions (Fig. 3B). The interfering distance of the high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) was measured to be 0.49 nm, indicating the presence of the (101) plane in the crystal lattice of CSLe@MnO₂NPs (refer to Fig. 3C). Additionally, the interfering distance was found to be 0.65 nm, corresponding to the (211) plane of the CSH/CSLe@MnO₂NPs crystal lattice (refer to Fig. 3D). The transmission electron micrographs (TEM) reveal the presence of spherical morphology and uniform dispersion of CSLe@MnO₂ nanoparticles. The electron diffraction pattern obtained from the selected area electron diffraction (SAED) technique exhibits diffraction rings that may be attributed to the (101) and (200) crystallographic planes, as seen in Fig. 3E. The diffraction rings shown in Fig. 3F correspond to the (211) planes, which provide evidence for the presence of the spinel hausmannite structure in the SCH/CSLe@MnO₂NPs. Moreover, the size distribution of NPs were determined and shown in Fig. 3G and H. The experimental findings demonstrated that the CSLe@MnO₂NPs composite exhibited a particle size of 25.27 nm, as shown in Fig. 3G. Additionally, the CSH/CSLe@MnO₂NPs composite displayed a particle size of 98.87 nm, as illustrated in Fig. 3H.

Antimicrobial activity by agar well diffusion assay and MICs and MBC assays

The antibacterial potentialities of pristine CSLe, CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs conjugates were evaluated against the bacterial strains of Gram-negative (*A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *E. coli*) and Gram-positive (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, and

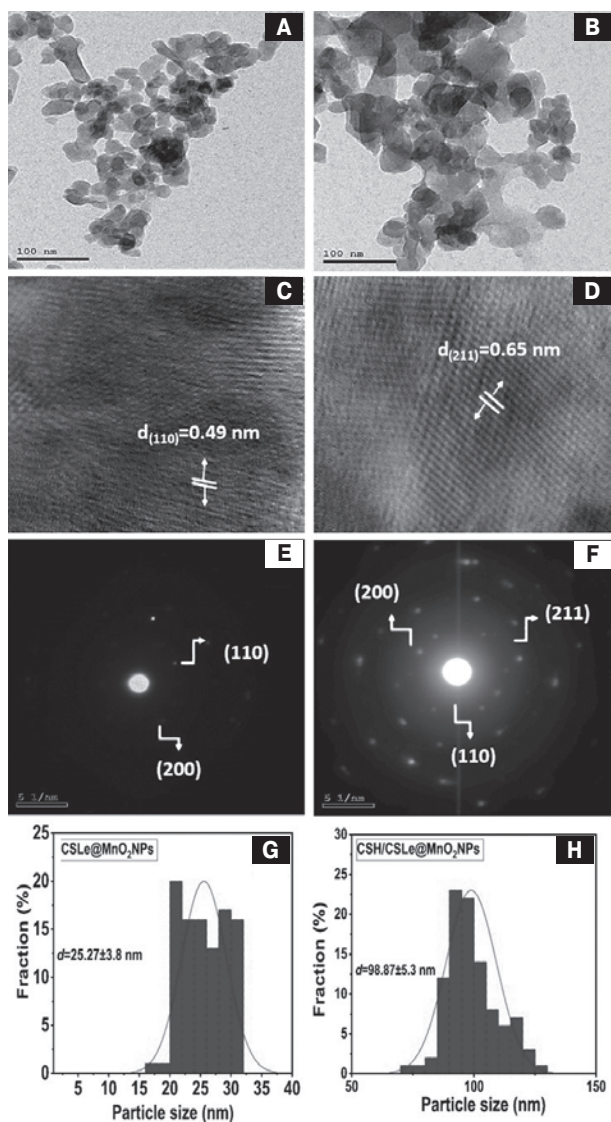


Figure 3. Physico-chemical characterization (A and B) TEM image. (C and D) High-resolution TEM (HRTEM) image and (E and F) SAED pattern of the same. of a single nanoparticle. (G and H) Size distribution measured by TEM of CSLe@MnO₂NPs, and CSH/CSLe@MnO₂NPs composite

E. faecalis) compared to leaves extract of CSLe. The results obtained are listed in Table 1 and shown in Fig. 4 (see cover III). After incubation period, CSLe were found to be bactericidal up to a certain extent against all the tested strains. CSLe were displayed lowest inhibition zone of 21 mm of *E. coli* and the largest inhibition zone of 29 mm of *S. aureus*. However, the experimental results showed that the CSLe@MnO₂NPs are good antibacterial agents. The lowest zones of inhibition have been found as 25 mm for *K. pneumoniae*, and the largest inhibition zone of 31 mm of *S. aureus* and *E. faecalis*. Furthermore, the optimally yielded CSH/CSLe@MnO₂NPs conjugate was found to be highly bactericidal against all test strains. As shown in Fig. 4, zone value reduction from 33 mm against *S. haemolyticus* and 31 mm against *A. baumannii* was recorded.

The broth dilution technique was used to determine the bacteriostatic effects of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs against various harmful bacteria. As shown in Table 2, SCLe, and SCLe@MnO₂NPs showed antimicrobial against Gram-negative and Gram-positive bacteria. At low concentrations, However, coated CSH onto SCLe@MnO₂NPs were increased the activity significantly. In contrast, the MIC results revealed that CSH/SCLe@MnO₂NPs were more potent against Gram-negative bacteria than other nanosubstances. The results showed that MIC of the SCLe@MnO₂NPs for the selected Gram-positive bacterial isolates was 12.5 µg/ml of *S. aureus*. While the visual turbidity test showed that CSH/SCLe@MnO₂NPs inhibited *E. coli* and *K. pneumoniae* strains (12.5 µg mL⁻¹) was close to the standard antibiotic gentamicin control inhibition effectiveness varied (8 µg mL⁻¹)

Anti-Biofilm Formation

After 24 h treatment and incubation, our findings indicate that the application of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs at sub-inhibitory concentrations resulted in a significant decrease in the formation of individual bacterial biofilms, as shown by the observed reduction in OD₅₇₀ nm values. The production of biofilms by *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *E. coli* was shown to decrease in a way that was dependent on the dosage of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs, as depicted in Figs. 5A, B, and C. In comparison to the control group, the use of SCLe resulted in a significant decrease in biofilm formation. The greatest inhibitory effect was seen with *S. aureus* bacteria, showing an inhibition rate of around 73.62%. However, the percentage of inhibition was somewhat lower when SCLe was associated with *A. baumannii*, at approximately 73.95% (Fig. 5A). In addition, the experimental investigation involving the application of nano-samples SCLe@MnO₂NPs and CSH/SCLe@MnO₂NPs for the treatment of biofilms revealed noteworthy outcomes. Specifically, the analysis indicated that the bacteria *S. aureus* exhibited the highest inhibition percentage, with rates of approximately 88.89% and 91.16% for SCLe@MnO₂NPs and CSH/SCLe@MnO₂NPs, respectively. Conversely, the bacteria *K. pneumoniae* demonstrated the lowest inhibition percentage, with rates of about 79.28% and 89.62% for SCLe@MnO₂NPs and CSH/SCLe@MnO₂NPs, respectively (refer to Figs. 5B and C). The quantity of biofilm that developed in the presence of these organisms was contrasted with the quantity of biofilm that formed in their absence. That is, without the use of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs. Hence, it can be inferred that the use of chitosan-coated SCLe@MnO₂NPs has promise as a viable therapeutic approach for the management of bacterial infections and perhaps other ailments connected with biofilm formation.

Table 1. Zone diameter (mm) interpretative standards chart and tested samples for the disc diffusion method of determining antimicrobial sensitivity and resistance status of common human bacterial pathogens

No.	Isolate Name	Antibacterial activity (mm)				
		-ve	+ve	SCLe	SCLe @MnO ₂ NPs	SCH/SCLe@MnO ₂ NPs
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	25	29	31	34
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	21	23	29	33
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	22	27	31	35
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	20	22	24	31
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	20	22	25	33
6	<i>Escherichia coli</i>	0	22	21	26	33

Table 2. MIC determinations of the NPs against fungal and bacterial human pathogens micro-strains

Tested microorganisms	Samples					
	SCLe (mg/ml)		SCLe@MnO ₂ NPs (µg/ml)		CSH/SCLe@MnO ₂ NPs (µg/ml)	
	MICs	MBCs	MICs	MBCs	MICs	MBCs
Gram positive bacteria						
<i>E. faecalis</i>	25	100	25	50	50	100
<i>S. aureus</i>	50	100	12.5	25	50	100
<i>S. hominis</i>	50	100	25	50	50	100
Gram negative bacteria						
<i>E. coli</i>	50	100	50	50	12.5	25
<i>K. pneumoniae</i>	50	100	50	50	12.5	25
<i>A. baumannii</i>	25	100	50	50	25	50

Cytotoxicity against and morphological features of normal Vero ATCC CCL-81 and PC3 prostate cancer cells

The literature extensively documents the cytotoxicity of pure metal nanoparticles derived from various sources. Nevertheless, there is a lack of available data regarding the cytotoxicity of MnO₂NPs synthesized using green methods, specifically utilizing leaf extracts from *C. spinosa* and conjugating them with bee chitosan. This cytotoxicity assessment is intended to be conducted on Vero ATCC CCL-81 cells and the PC3 prostate cancer cell line. These nanoparticles have significant potential for various biomedical applications, particularly in combating human carcinoma. To bolster the comprehensiveness of our research, we undertook an inquiry into the cytotoxic properties and anticancer potential of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs conjugates. The investigation was conducted on Vero cells, which are considered normal, and PC3 prostate cancer cells. The Vero cells and PC3 cancer cells were cultivated in 96-well microtiter plates at a temperature of 37°C in the presence of each SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs. Three replicates were performed for each concentration, and an untreated control sample was included in the experiment. The toxicological impact was quantified by evaluating the extent of growth suppression shown by the SCLe, MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs in relation to the control group, which showed a growth rate of 100%. Fig. 6 (see cover III) illustrates the cytotoxic characteristics of the chemicals under investigation, as represented by the percentage of cellular viability.

The optimally generated CSH/SCLe@MnO₂NPs conjugates showed decreased cell viability in Vero cells and PC3 malignant cells as compared to the control sample. It was shown that this decrease in cell viability was dose-dependent, with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀). Furthermore, it was noted that 48 h of incubation were required for the IC₅₀ of the evaluated SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs conjugates against Vero cells and PC3 cancer cells. The CSH/SCLe@MnO₂ nanoparticle conjugates may have anticancer effects, as shown by the observed inhibitory concentration and rate of cell death/viability. At high doses (250 µg mL⁻¹), a considerable amount of cytotoxicity (83.38%) was detected when Vero cells were exposed to CSH/SCLe@MnO₂NPs. It was found that the IC₅₀ values for this therapy were 116.11±3.36 µg mL⁻¹. Comparatively, at the same concentrations, the cytotoxicity of SCLe and MnO₂NPs alone produced lower levels of cytotoxicity (49.68% and 51.54%, respectively). The results showed that the IC₅₀ values for SCLe and SCLe@MnO₂NPs alone were 2252.01±4.14 µg mL⁻¹ and 245.35±4.9 µg mL⁻¹, in that order (Fig. 6A). Moreover, at high doses of 250 µg/mL⁻¹, PC3 cells treated with CSH/SCLe@MnO₂NPs showed a 69.39% cytotoxic impact. The treatment's IC₅₀ values were found to be 205.25±2.53 µg mL⁻¹. By contrast, at the same doses, SCLe and SCLe@MnO₂NPs alone demonstrated cytotoxicity of 55.20% and 64.44%, respectively. The results showed that the IC₅₀ values for SCLe and SCLe@MnO₂NPs were 236.84±8.58 µg mL⁻¹ and 213.11±3.96 µg mL⁻¹, respectively. Data shown in Fig. 6B.

Morphological features

The morphological properties of PC3 cancer cell lines, untreated normal Vero cell lines, and cell lines treated with different dosages of SCLe, MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs are all reported and compared in this work. The absorbance values acquired

from the 3T3 Phototox program were used to determine the amounts of prepared samples in various cell lines. Following the red dye’s capture and accounting for the amounts of SCLe, MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs used in the viability assays, these absorbance values were determined (Figs. 6C and D).

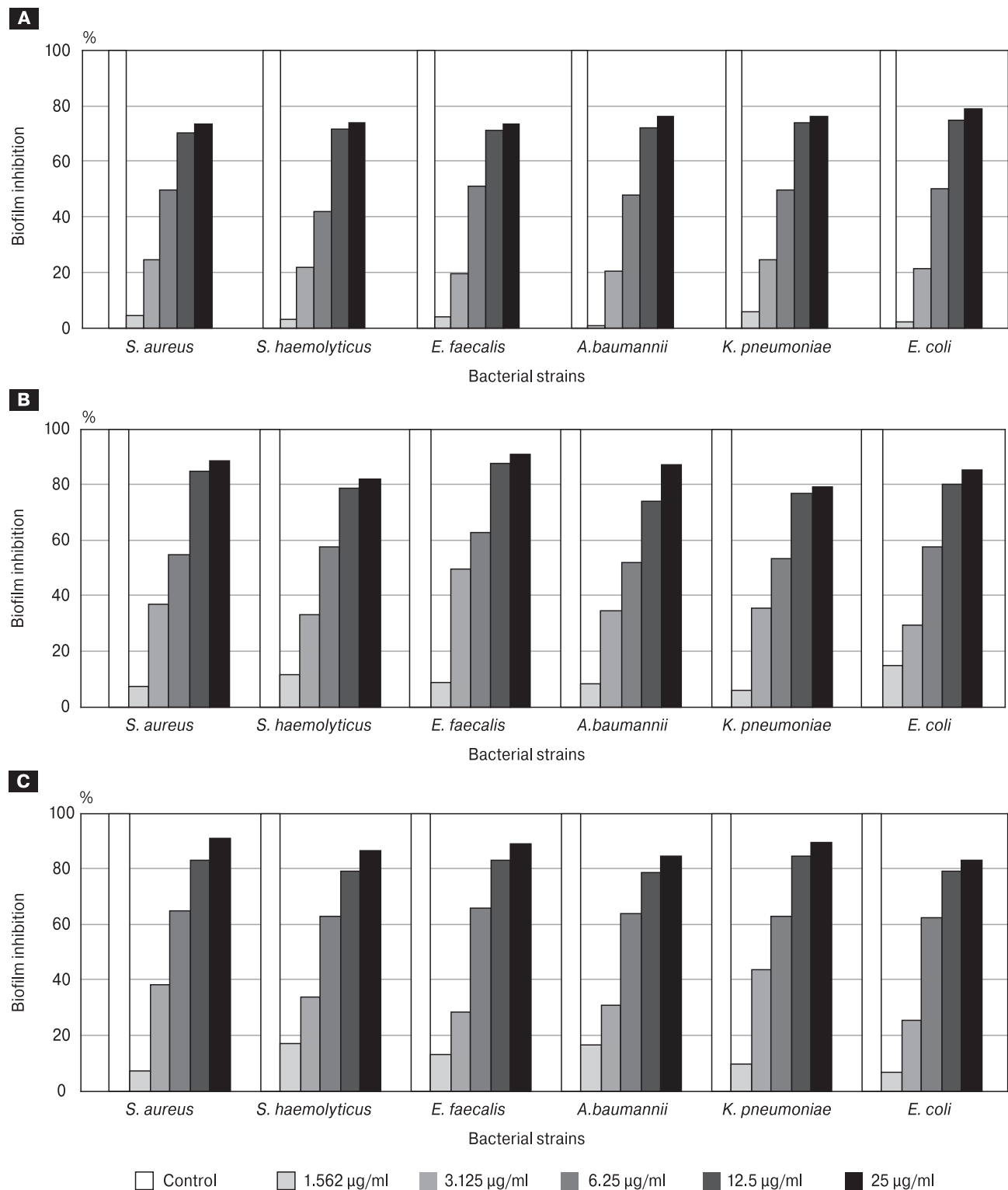


Figure 5. Anti-biofilm activity of (A) SCLe, (B) SCLe@MnO₂NPs, and (C) CSH/SCLe@MnO₂NPs against selected isolated bacteria pathogen’s

Discussion

The demand for environmentally friendly synthesis methods for nanoparticles has surged, driven by the widespread use of metal-based nanomaterials in diverse sectors, including industry, medicine, and environmental applications [7]. In recent years, there has been a growing emphasis on harnessing the potential of herbal medicines, abundant in diverse phytochemicals, for the eco-friendly synthesis of nanoparticles. This approach shows promise in combating bacterial infections and contributing to cancer prevention [68]. Consequently, we utilized *C. spinosa* for the synthesis of MnO₂NPs. Through HPLC, we identified and purified 19 chemical compounds. Environmental factors, such as temperature, soil composition, water availability, and humidity, have been shown to impact plant growth, the production of secondary metabolites, and biological activities, potentially reflected in the HPLC results [25]. In our research, we examined the enhanced antibacterial, antibiofilm, and anticancer properties of CSLe when employed in the biofabrication of MnO₂NPs. Importantly, the resulting CSLe@MnO₂NPs did not exhibit cytotoxic effects. Despite using identical source materials, variations in surface composition, aggregation patterns, and nanoparticle sizes gave rise to differences in observed biological activities and NPs related cytotoxicity [46]. The formation of the absorption peak at 350 nm indicated the presence of MnO₂NPs [68]. The intensity of absorption peaks at the same wavelength (350 nm) was used to measure the NPs yield. The peak at 350 nm is due to d–d electron transitions of Mn⁴⁺ ions in MnO₂NPs [24]. Surface functionalizing ligands, nanoparticle size, and surface charge represent three critical determinants influencing the precise distribution of nanomaterials within living organisms. In this context, we have modified CSLe@MnO₂NPs by introducing a biocompatible ligand, chitosan, owing to its established capacity to selectively target and adhere to the outer membrane of bacteria. This strategic modification is expected to enhance the penetration of MnO₂NPs and their interaction with cellular organelles within microbial cells [25, 46]. According to our findings, FTIR spectra of SCLe, CSLe@MnO₂NPs and CSH/SCLe@MnO₂NPs exhibited absorption peaks similar with previous report [67]. Furthermore, TEM and SEM results showed that the particle size of clearly in CSH/SCLe@MnO₂NPs greater than CSLe@MnO₂NPs which indicates that the addition of CSH increased the size of the SCLe@MnO₂NPs and the particles size dispersion was in the desired range of reported nano [12, 38]. These observations deviated somewhat from the findings of Fabre et al., 2020 [43], where they observed that unloaded nanoparticles were smaller in size than loaded nanoparticles. The characteristics identified in the EDX analysis align with prior research studies [13, 46, 63].

Our HPLC analysis revealed that the plant extract is rich in phenolic compounds, flavonoids, and terpenoids, known for their active antimicrobial and anti-biofilm properties [56, 69]. Phenolic compounds play a pivotal role in biofilm formation at the cellular level by inducing several significant changes. These changes involve altering the stiffness of the cell wall, increasing the permeability of the cell membrane, and influencing various intracellular processes. These effects occur primarily through the formation of hydrogen bonds between phenolic compounds and enzymes within the cell. This interaction can disrupt the structural integrity of the cell wall, compromise the integrity of the cell membrane, and interfere with essential cellular processes [32]. Consistent with our findings, numerous well-regarded studies have extensively examined the correlation between the antibacterial effectiveness of flavonoids and their structural characteristics. Additionally, several research groups have elucidated the antibacterial mechanisms of specific flavonoids. For instance, the antibacterial activity of quercetin has been attributed to its ability to inhibit DNA gyrase, a critical enzyme involved in bacterial DNA replication and repair processes [11]. Moreover, in a separate study involving different flavonoids tested against various strains of *K. pneumoniae*, all flavonoids demonstrated antimicrobial activity comparable to the standard antibacterial agent ofloxacin. This underscores the potential of flavonoids as effective antimicrobial agents and highlights the diversity of their antibacterial mechanisms [44].

On the other hand, metal oxide nanoparticles, including copper oxide (CuO), manganese oxide (MnO), zinc oxide (ZnO), nickel oxide (NiO), magnesium oxide (MgO), iron oxide (FeO), ferric oxide (Fe₂O₃), and chromium oxide (Cr₂O₃), among others, have garnered significant attention and exploration for various biological applications. These nanoparticles have been extensively studied for their potential in antibacterial, antibiofilm, and anticancer application [55]. Metal oxide nanoparticles exhibit unique properties that make them suitable for a wide range of biological uses. Their antimicrobial properties can help combat bacterial and fungal infections. Our antimicrobial findings align with previous studies by Manjula et al. [41, 50] and Kunkalekar et al. [36], which also observed a stronger inhibitory effect of Manganese dioxide (MnO₂) nanoparticles against Gram-positive bacteria compared to Gram-negative bacteria. This discrepancy in effectiveness might be attributed to diverse mechanisms at play, such as DNA damage and disruption of the bacterial cell membrane. MnO₂NPs have demonstrated a differential impact on Gram-positive and Gram-negative bacteria due to variations in their cell wall structures. The rigid peptidoglycan layer in Gram-positive bacteria makes them more susceptible to damage, including DNA strand breakage, induced by the oxidative stress generated by MnO₂NPs. In contrast, the outer

membrane of Gram-negative bacteria, composed of lipopolysaccharides, provides a protective barrier against some nanoparticles, making them comparatively more resilient [28]. The antibacterial efficacy of SCLe@MnO₂NPs can be attributed to their relatively small size, facilitating their penetration into bacterial cells, and subsequent disruption of the cell membranes. The small size of these nanoparticles allows them to infiltrate the bacterial cells effectively, where they interact with the cell membrane. As a result of this interaction, the cell membrane integrity is compromised, leading to structural damage and permeability changes. These alterations create an environment where vital cellular processes are disrupted, eventually culminating in the demise of the bacterial cell [27]. In a study conducted by Khan et al. [30], they successfully synthesized MnO NPs through the utilization of *A. indicum*, followed by an assessment of the green-synthesized AI-MnONPs. Interestingly, the AI-MnONPs demonstrated a notably high and comparable antibacterial effectiveness against *B. subtilis* and *S. aureus* when compared to conventional antibiotic drugs. This enhanced antibacterial impact could be attributed to a variety of factors, particularly the influence of the nanoparticle structure and composition on key bacterial cell membrane properties [37, 61]. In addition, a study by Souri et al., 2018 [65], manganese oxide nanoparticles were synthesized using lemon extract and curcumin extract. The research yielded compelling results, indicating that MnONPs modified with curcumin and aniline exhibited superior antibacterial effectiveness. These modified MnONPs demonstrated a remarkable capability to prevent the growth of various bacterial pathogens, including *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhi* as well as fungal strains like *C. albicans*, *C. lunata*, and *T. simii* [22, 58]. In 2015, Azhir and colleagues synthesized manganese trioxide (Mn₃O₄) nanoparticles using the precipitation method. These Mn₃O₄ NPs exhibited robust antimicrobial activity against bacterial pathogens, specifically *E. coli* and *S. aureus*. Notably, when evaluating the antibacterial characteristics of these nanoparticles, a noteworthy observation emerged: *E. coli* displayed a higher degree of sensitivity to Mn₃O₄NPs in comparison to Gram-positive bacteria like *S. aureus*. This discrepancy in response may be attributed to variations in the structural composition of bacterial cell walls [6]. In a separate study, Joshi et al. in 2020 successfully synthesized manganese dioxide nanoparticles, which exhibited notable antimicrobial activity against a range of bacteria, including *S. aureus*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. mutants*, and *E. coli* [28]. Likewise, Kumar et al. conducted experiments wherein Mn₃O₄ nanoparticles were prepared at various pH levels, and their antimicrobial properties were assessed using the disk diffusion method. Their findings indicated that these nanoparticles exhibited stronger antibacterial effects against Gram-negative bacteria compared to Gram-positive

ones [35]. This differential response is attributed to the presence of negative charge domains on the cell walls of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, Mn₃O₄ nanoparticles are able to penetrate the outer membrane and interact with the underlying cell wall and membrane components [10]. Our hypothesis revolves around the idea that the increased alkalinity of chitosan-coated SCLe@MnO₂NPs may be attributed to the presence of negatively charged domains on bacterial cell walls. This negative charge is believed to play a significant role in how chitosan-coated SCLe@MnO₂NPs interact with bacterial cell walls, primarily through electrostatic forces or coordination-derived forces. Additionally, it's important to note that metallic nanoparticles often carry a positive charge on their surface, which can further contribute to their ability to disrupt bacterial cell walls and enhance the permeability of nanoparticles into the cells [23, 71].

The broth dilution technique employed to assess the bacteriostatic effects of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs against a range of pathogenic bacteria [59]. Notably, the heightened antibacterial effectiveness of CSH/SCLe@MnO₂NPs can be attributed to a synergistic interplay between the physical characteristics of the nanoparticles and the adsorption of bioactive phytochemicals from the leaves extract of *C. spinosa* onto their surface [39]. These results also highlighted that the synthesized CSH/SCLe@MnO₂NPs displayed greater activity against Gram-positive bacteria in contrast to their efficacy against Gram-negative bacterial species. This differential response is likely linked to the structural and compositional differences between the cell walls of Gram-negative and Gram-positive bacterial strains [41]. Nanopolymers, particularly nanochitosan, have been extensively investigated due to their unique bioactivity and their utility as carriers for drug delivery, as well as their antimicrobial, antitumor, and gene delivery capabilities, either in isolation or in combination with other active compounds [15, 18]. Numerous prior studies have also reported similar findings, highlighting the greater efficacy of unmodified chitosan against Gram-negative bacterial strains compared to Gram-positive ones [8, 14, 16, 64].

Numerous research studies have revealed the presence of various anticancer mechanisms linked to chitosan-based nanoparticles. These nanoparticles have exhibited substantial effectiveness in suppressing the proliferation of human carcinoma cell lines in vitro experiments [26, 51, 53]. In our study, we conducted an evaluation of SCLe, SCLe@MnO₂NPs, and CSH/SCLe@MnO₂NPs in vitro against both normal and cancer cell lines. We aimed to assess their impact on cell morphology and potential cytotoxic effects. To do this, we utilized 3T3 Phototox software to observe identifiable morphological features associated with apoptosis after exposing normal Vero ATCC CCL-81 and PC3 prostate cancer cell lines to these

samples for 24 h. The results of this evaluation revealed concentration-dependent morphological changes in the cells, particularly evident in the concentration range of 250 to 500 µg mL⁻¹. Notably, the enhanced cytotoxicity observed with CSH/SCLe@MnO₂NPs can be linked to an increase in the generation of hydrogen peroxide (H₂O₂). This heightened H₂O₂ production follows the conversion of SCLe crude extract into highly reactive superoxide or hydroxyl radicals [54]. Furthermore, the antioxidant properties and protective effects of the plant extracts can be attributed to the presence of total phenolic, total flavonoid, total saponins, and total alkaloids content in SCLe. These compounds are capable of scavenging free radicals, reducing reactive oxygen species (ROS), and thereby minimizing oxidative stress. Additionally, these phytochemical substances can influence intracellular redox processes and the balance of ROS, leading to the conversion of ROS into highly reactive superoxide or hydroxyl radicals, subsequently resulting in oxidative stress [31, 42]. This oxidative stress can lead to various cellular outcomes, including apoptosis, DNA damage, cytotoxicity, and disruptions in cell signaling [17]. Importantly, after 24 h of incubation with the various cell lines, no discernible cytotoxicity or intracellular ROS generation was observed in any of the samples at doses up to 250 µg mL⁻¹. These findings suggest that chitosan-based nanoparticles may hold significant potential as therapeutic agents for the treatment of human carcinoma. Their selective cytotoxicity towards cancer cells while sparing normal cells makes them promising candidates for further development as anticancer treatments.

Conclusion

In conclusion, this study has successfully developed a straightforward and cost-effective method for synthesizing MnO₂NPs utilizing leaf extracts from *C. spinosa*. The nanoparticles underwent thorough characterization, resulting in the synthesis

of CSLe@MnO₂NPs and CSH/CSLe@MnO₂NPs. These nanomaterials exhibited distinctive features, including ligand-to-metal charge transfer and photoluminescence. The introduction of chitosan coating led to more uniform particle sizes. Significantly, these nanomaterials demonstrated potent antibacterial properties against a broad spectrum of bacterial strains, with CSH/CSLe@MnO₂NPs displaying exceptional efficacy. They also exhibited low MIC values, particularly against *S. aureus*. Additionally, the nanomaterials showcased notable anti-biofilm capabilities in a dose-dependent manner, addressing the challenge of biofilm-related infections. Cytotoxicity assessments underscored their potential in anticancer applications, with dose-dependent reductions in cell viability observed in both normal and cancer cells. This comprehensive study highlights the versatility and promise of CSH/CSLe@MnO₂NPs across various biomedical applications, presenting exciting prospects for future research and advancements in the fields of nanomedicine and biotechnology.

Acknowledgements

The author extend their appreciation to the deanship of scientific research at Shaqra University for funding this research work through the project number (SU-ANN-2023059).

Additional information

Ethics approval. The research protocol was reviewed and approved by the ethics committee of the Shaqra University, Saudi Arabia (approval number: ERC_SU_20230033) and all procedures were carried out in accordance with the applicable rules and regulations. The study was carried out in accordance with ARRIVE guidelines.

Competing interests. There are no declared conflicts of interest for the authors.

References

1. Abd-ElGawad A.M., El-Amier Y.A., Assaeed A.M., Al-Rowaily S.L. Interspecific variations in the habitats of *Reichardia tinigitana* (L.) Roth leading to changes in its bioactive constituents and allelopathic activity. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2020, vol. 27, no. 1, pp. 489–499. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.11.015
2. Alqahtani A.S., Nasr F.A., Ahmed M.Z., Bin Mansour M.Y., Biksmawi A.A., Noman O.M., Herqash R.N., Al-zharani M., Qurtam A.A., Rudayni H.A.J.O.C. In vitro protective and anti-inflammatory effects of *Capparis spinosa* and its flavonoids profile. *Open Chemistry*, 2023, vol. 21, no. 1: 20230186. doi: 10.1515/chem-2023-0186
3. Alshawwa S.Z., Mohammed E.J., Hashim N., Sharaf M., Selim S., Alhuthali H.M., Alzahrani H.A., Mekky A.E., Elharrif M.G. In Situ Biosynthesis of Reduced Alpha Hematite (α -Fe₂O₃) Nanoparticles by *Stevia Rebaudiana* L. Leaf Extract: Insights into Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Properties. *Antibiotics (Basel)*, 2022, vol. 11, no. 9: 1252. doi: 10.3390/antibiotics11091252
4. Arif M., Sharaf M., Samreen, Khan S., Chi Z., Liu C.G. Chitosan-based nanoparticles as delivery-carrier for promising antimicrobial glycolipid biosurfactant to improve the eradication rate of *Helicobacter pylori* biofilm. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2021, vol. 32, no. 6, pp. 813–832. doi: 10.1080/09205063.2020.1870323
5. Azhir E., Etefagh R., Mashreghi M., Pordeli P.J.P.C.R. Preparation, characterization and antibacterial activity of manganese oxide nanoparticles. *Physical Chemistry Research*, 2015, vol. 3, no. 3, pp. 197–204.
6. Bakour M., Campos M.d.G., Imtara H., Lyoussi B. Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD. *Journal of Apicultural Research*, 2020, vol. 59, no. 1, pp. 35–41.

7. Bilal M., Zhao Y., Rasheed T., Ahmed I., Hassan S.T.S., Nawaz M.Z., Iqbal H.M.N. Biogenic Nanoparticle–Chitosan Conjugates with Antimicrobial, Antibiofilm, and Anticancer Potentialities: Development and Characterization. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, vol. 16, no. 4: 598. doi: 10.3390/ijerph16040598
8. Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*, 2005, vol. 54, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.2337/diabetes.54.1.1
9. Chandrasekaran R., Gnanasekar S., Seetharaman P., Keppanan R., Arockiaswamy W., Sivaperumal S. Formulation of Carica papaya latex-functionalized silver nanoparticles for its improved antibacterial and anticancer applications. *J. Mol. Liq.*, 2016, vol. 219, pp. 232–238.
10. Cushnie T.P., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, vol. 26, no. 5, pp. 343–356. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
11. Danaei M., Dehghankhold M., Ataei S., Hasanzadeh Davarani F., Javanmard R., Dokhani A., Khorasani S., Mozafari M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 2018, vol. 10, no. 2: 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057
12. Dang T.-D., Cheney M.A., Qian S., Joo S.W., Min B.-K. A novel rapid one-step synthesis of manganese oxide nanoparticles at room temperature using poly (dimethylsiloxane). *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2013, vol. 52, no. 7, pp. 2750–2753.
13. Eaton P., Fernandes J.C., Pereira E., Pintado M.E., Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Ultramicroscopy*, 2008, vol. 108, no. 10, pp. 1128–1134. doi: 10.1016/j.ultramicro.2008.04.015
14. El Rabey H.A., Almutairi F.M., Alalawy A.I., Al-Duais M.A., Sakran M.I., Zidan N.S., Tayel A.A. Augmented control of drug-resistant Candida spp. via fluconazole loading into fungal chitosan nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, vol. 141, pp. 511–516. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.036
15. Elgadir M.A., Uddin M.S., Ferdosh S., Adam A., Chowdhury A.J.K., Sarker M.Z.I. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review. *J. Food. Drug Anal.*, 2015, vol. 23, no. 4, pp. 619–629. doi: 10.1016/j.jfda.2014.10.008
16. Elnosary M.E., Aboelmagd H.A., Habaka M.A., Salem S.R., El-Naggar M.E. Synthesis of bee venom loaded chitosan nanoparticles for anti-MERS-COV and multi-drug resistance bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, vol. 224, pp. 871–880. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.173
17. Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J. Food. Drug Anal.*, 2014, vol. 22, no. 1, pp. 64–75. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.005
18. Gan Q., Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier — systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2007, vol. 59, no. 1, pp. 24–34. doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.04.009
19. Harrigan W.F., McCance M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic Press Inc. (London) Ltd.*, 1976.
20. Hoseinpour V., Ghaemi N. Novel ZnO–MnO₂–Cu₂O triple nanocomposite: facial synthesis, characterization, antibacterial activity and visible light photocatalytic performance for dyes degradation — a comparative study. *Materials Research Express*, 2018, vol. 5, no. 8: 085012.
21. Ingale A.G., Chaudhari A.N. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 2013, vol. 4, no. 165, pp. 1–7. doi: 10.4172/2157-7439.1000165
22. Jaganyi D., Altaf M., Wekesa I. Synthesis and characterization of whisker-shaped MnO₂ nanostructure at room temperature. *Appl. Nanosci.*, 2013, vol. 3, pp. 329–333. doi: 10.1007/s13204-012-0135-3
23. Jayandran M., Muhamed haneefa M., Balasubramanian V. Green synthesis and characterization of Manganese nanoparticles using natural plant extracts and its evaluation of antimicrobial activity. *J. App. Pharm. Sci.*, 2015, vol. 5, no. 12, pp. 105–110. doi: 10.7324/JAPS.2015.501218
24. Jeyaraj M., Sathishkumar G., Sivanandhan G., MubarakAli D., Rajesh M., Arun R., Kapildev G., Manickavasagam M., Thajuddin N., Premkumar K., Ganapathi A. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2013, vol. 106, pp. 86–92. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.027
25. Joshi N.C., Joshi E., Singh A. Biological Synthesis, Characterisations and Antimicrobial activities of manganese dioxide (MnO₂) nanoparticles. *Research J. Pharm. and Tech.*, 2020, vol. 13, no. 1, pp. 135–140.
26. Joshi N.C., Siddiqui F., Salman M., Singh A. Antibacterial Activity, Characterizations, and Biological Synthesis of Manganese Oxide Nanoparticles using the Extract of Aloe vera. *Asian Pac. J. Health Sci.*, 2020, vol. 7, no. 3, pp. 27–29. doi: 10.21276/ap-jhs.2020.7.3.7
27. Kant R., Pathak S., Dutta V. Design and fabrication of sandwich-structured α -Fe₂O₃/Au/ZnO photoanode for photoelectrochemical water splitting. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2018, vol. 178, pp. 38–45. doi: 10.1016/j.solmat.2018.01.005
28. Khan S.A., Shahid S., Shahid B., Fatima U., Abbasi S.A. Green Synthesis of MnO Nanoparticles Using Abutilon indicum Leaf Extract for Biological, Photocatalytic, and Adsorption Activities. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 5: 785. doi: 10.3390/biom10050785
29. Khanna P., Ong C., Bay B.H., Baeg G.H. Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials (Basel)*, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 1163–1180. doi: 10.3390/nano5031163
30. Khaydarova H.A., Ikhtiyarova G.A., Khaydarova A.A. Method of obtaining a chitosan aminopolisaccharide from behbat Apis Mellifera. *Journal of Chemistry Kazakhstan*, 2019, no. 2, pp. 69–74.
31. Khomsi M.E., Imtara H., Kara M., Hmamou A., Assouguem A., Bourkhiss B., Tarayrah M., AlZain M.N., Alzamel N.M., Noman O., Hmouni D. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Total Polyphenols of Anchusa italica Retz. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 2: 416. doi: 10.3390/molecules27020416
32. Kravanja G., Primožič M., Knez Ž., Leitgeb M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 10: 1960. doi: 10.3390/molecules24101960
33. Kulkarni A.P., Srivastava A.A., Nagalgaon R.K., Zunjarrao R.S. Phytofabrication of Silver Nanoparticles from a Novel Plant Source and Its Application. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2012, no. 3, pp. 417–421.

34. Kumar G.S., Venkataramana B., Reddy S.A., Maseed H., Nagireddy R.R. Hydrothermal synthesis of Mn₃O₄ nanoparticles by evaluation of pH effect on particle Size formation and its antibacterial activity. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 2020, no. 11: 035006. doi: 10.1088/2043-6254/ab9cac
35. Kunkalekar R. Role of oxides (Fe₃O₄, MnO₂) in the antibacterial action of Ag-metal oxide hybrid nanoparticles. *Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles. Elsevier*, 2019, pp. 303–312.
36. Li Y., Liu J., Wang L., Zhang J., Wang Z., Gao Z., Zhong Y., Zhang D. Notice of Retraction: Preparation and Characterization of Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄@Au Composite Nanoparticles and Its Anti-Tumor Effect on Hepatocellular Carcinoma Cells. *5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. Wuhan, China, 2011*, pp. 1–4. doi: 10.1109/icb-be.2011.5781653
37. Lotfy V.F., Basta A.H. A green approach to the valorization of kraft lignin for the production of nanocomposite gels to control the release of fertilizer. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2022, vol. 16, no. 2, pp. 488–498. doi: 10.1002/bbb.2317
38. Lu H., Zhang X., Khan S.A., Li W., Wan L. Biogenic Synthesis of MnO₂ Nanoparticles With Leaf Extract of Viola betonicifolia for Enhanced Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Biocompatible Applications. *Front. Microbiol.*, 2021, no. 12: 761084. doi: 10.3389/fmicb.2021.761084
39. Majani S.S., Sathyan S., Manoj M.V., Vinod N., Pradeep S., Shivamallu C., Venkatachalaiah K., Kollur S.P. Eco-friendly synthesis of MnO₂ nanoparticles using Saraca asoca leaf extract and evaluation of in vitro anticancer activity. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 2023, vol. 6: 100367. doi: 10.1016/j.crgsc.2023.100367
40. Manjula R., Thenmozhi M., Thilagavathi S., Srinivasan R., Kathirvel A. Green synthesis and characterization of manganese oxide nanoparticles from Gardenia resinifera leaves. *Materials Today: Proceedings*, 2020, vol. 26, pp. 3559–3563. doi: 10.1016/j.matpr.2019.07.396
41. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed. Res. Int.*, 2013, no. 2013: 942916. doi: 10.1155/2013/942916
42. Marchand G., Fabre G., Maldonado-Carmona N., Villandier N., Leroy-Lhez S. Acetylated lignin nanoparticles as a possible vehicle for photosensitizing molecules. *Nanoscale Adv.*, 2020, vol. 2, no. 12, pp. 5648–5658. doi: 10.1039/d0na00615g
43. Mohamed D.I., Alaa El-Din Aly El-Waseef D., Nabih E.S., El-Kharashi O.A., Abd El-Kareem H.F., Abo Nahas H.H., Abdel-Wahab B.A., Helmy Y.A., Alshawwa S.Z., Saied E.M. Acetylsalicylic Acid Suppresses Alcoholism-Induced Cognitive Impairment Associated with Atorvastatin Intake by Targeting Cerebral miRNA155 and NLRP3: In Vivo, and In Silico Study. *Pharmaceutics*, 2022, vol. 14, no. 3: 529. doi: 10.3390/pharmaceutics14030529
44. Mohamed D.I., Ezzat S.F., Elayat W.M., El-Kharashi O.A., El-Kareem H.F.A., Nahas H.H.A., Abdel-Wahab B.A., Alshawwa S.Z., Saleh A., Helmy Y.A., Khairy E., Saied E.M. Hepatoprotective Role of Carvedilol against Ischemic Hepatitis Associated with Acute Heart Failure via Targeting miRNA-17 and Mitochondrial Dynamics-Related Proteins: An In Vivo and In Silico Study. *Pharmaceutics (Basel)*, 2022, vol. 15, no. 7: 832. doi: 10.3390/ph15070832
45. Moon S.A., Salunke B.K., Alkotaini B., Sathiyamoorthi E., Kim B.S. Biological synthesis of manganese dioxide nanoparticles by Kalopanax pictus plant extract. *IET Nanobiotechnol.*, 2015, vol. 9, no. 4, pp. 220–5. doi: 10.1049/iet-nbt.2014.0051
46. Morena A.G., Stefanov I., Ivanova K., Perez-Rafael S.I., Sanchez-Soto M., Tzanov T. Antibacterial polyurethane foams with incorporated lignin-capped silver nanoparticles for chronic wound treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2020, vol. 59, no. 10, pp. 4504–4514.
47. Neamah S.A., Albukhaty S., Falih I.Q., Dewir Y.H., Mahood H.B. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Capparis spinosa L. Fruit Extract: Characterization, Biocompatibility, and Antioxidant Activity. *Appl. Sci.*, 2023, vol. 13, no. 11: 6604. doi: 10.1016/B978-0-12-822446-5.00010-1
48. Özçelik B., Orhan D.D., Özgen S., Ergun F. Antimicrobial activity of flavonoids against extended-spectrum β -lactamase (ES β L)-producing Klebsiella pneumoniae. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2008, vol. 7, no. 4, pp. 1151–1157. doi: 10.4314/tjpr.v7i4.14701
49. Pagar T., Ghotekar S., Pagar K., Pansambal S., Oza R. Phytochemical synthesis of manganese dioxide nanoparticles using plant extracts and their biological application. *Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds. Elsevier*: 2021, pp. 209–218. doi: 10.3390/app13116604
50. Piao M.J., Kang K.A., Lee I.K., Kim H.S., Kim S., Choi J.Y., Choi J., Hyun J.W. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol. Lett.*, 2011, vol. 201, no. 1, pp. 92–100. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.010
51. Procop G.W., Church D.L., Hall G.S., Janda W.M. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. *Jones & Bartlett Publishers*, 2020. 1830 p.
52. Qi L.F., Xu Z.R., Li Y., Jiang X., Han X.Y. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J. Gastroenterol.*, 2005, vol. 11, no. 33, pp. 5136–5141. doi: 10.3748/wjg.v11.i33.5136
53. Raza M.A., Mukhtar F., Danish M. Cuscuta reflexa and Carthamus Oxyacantha: potent sources of alternative and complimentary drug. *Springerplus*, 2015, no. 4: 76. doi: 10.1186/s40064-015-0854-5
54. Razanamahandry L.C., Onwordi C.T., Saban W., Bashir A.K.H., Mekuto L., Malenga E., Manikandan E., Fosso-Kankeu E., Maaza M., Ntwampe S.K.O. Performance of various cyanide degrading bacteria on the biodegradation of free cyanide in water. *J. Hazard Mater.*, 2019, no. 380: 120900. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.120900
55. Ríos J.L., Recio M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, vol. 100, no. 1–2, pp. 80–84. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.025
56. Sankar Ganesh P., Ravishankar Rai V. Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa. *J. Tradit. Complement. Med.*, 2017, vol. 8, no. 1, pp. 170–177. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.05.008
57. Saod W.M., Hamid L.L., Alaallah N.J., Ramizy A. Biosynthesis and antibacterial activity of manganese oxide nanoparticles prepared by green tea extract. *Biotechnol. Rep. (Amst)*, 2022, vol. 34: e00729. doi: 10.1016/j.btre.2022.e00729

58. Selim M.S., Fatthallah N.A., Higazy S.A., Chen X., Hao Z. Novel blade-like structure of reduced graphene oxide/ α -Mn₂O₃ nanocomposite as an antimicrobial active agent against aerobic and anaerobic bacteria. *Materials Chemistry and Physics*, 2023, no. 298: 127436. doi: 10.1016/j.matchemphys.2023.127436
59. Selim M.S., Hamouda H., Hao Z., Shabana S., Chen X. Design of γ -AlOOH, γ -MnOOH, and α -Mn₂O₃ nanorods as advanced antibacterial active agents. *Dalton Trans.*, 2020, vol. 49, no. 25, pp. 8601–8613. doi: 10.1039/d0dt01689f
60. Severino R., Ferrari G., Vu K.D., Donsi F., Salmieri S., Lacroix M. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimurium on green beans. *Food Control*, 2015, vol. 50, pp. 215–222. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.08.029
61. Shahid S.A., Anwar F., Shahid M., Majeed N., Azam A., Bashir M., Amin M., Mahmood Z., Shakir I. Laser-Assisted synthesis of Mn_{0.50}Zn_{0.50}Fe₂O₄ nanomaterial: characterization and in vitro inhibition activity towards bacillus subtilis biofilm. *Journal of Nanomaterials*, 2015, vol. 16, no. 1: 111. doi: 10.1155/2015/896185
62. Sharaf M., Sewid A.H., Hamouda H.I., Elharrif M.G., El-Demerdash A.S., Alharthi A., Hashim N., Hamad A.A., Selim S., Alkhalifah D.H.M., Hozzein W.N., Abdalla M., Saber T. Rhamnolipid-Coated Iron Oxide Nanoparticles as a Novel Multitarget Candidate against Major Foodborne E. coli Serotypes and Methicillin-Resistant S. aureus. *Microbiol. Spectr.*, 2022, vol. 10, no. 4: e0025022. doi: 10.1128/spectrum.00250-22
63. Sharma G., Kumar A., Naushad M., García-Peñas A., Al-Muhtaseb A.H., Ghfar A.A., Sharma V., Ahamad T., Stadler F.J. Fabrication and characterization of Gum arabic-cl-poly(acrylamide) nanohydrogel for effective adsorption of crystal violet dye. *Carbohydr. Polym.*, 2018, vol. 202, pp. 444–453. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.09.004
64. Silva L.P. da, de Britto D., Selegim M.H.R., Assis O.B.G. In vitro activity of water-soluble quaternary chitosan chloride salt against E. coli. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 26, no. 11, pp. 2089–2092.
65. Soury M., Hoseinpour V., Shakeri A., Ghaemi N. Optimisation of green synthesis of MnO nanoparticles via utilising response surface methodology. *IET Nanobiotechnol.*, 2018, vol. 12, no. 6, pp. 822–827. doi: 10.1049/iet-nbt.2017.0145
66. Srinivasa C., Kumar S.R.S., Pradeep S., Prasad S.K., Veerapur R., Ansari M.A., Alomary M.N., Alghamdi S., Almeahdi M., Gc K., Daphedar A.B., Kakkalamele S.B., Shivamallu C., Kollur S.P. Eco-Friendly Synthesis of MnO₂ Nanorods Using Gmelina arborea Fruit Extract and Its Anticancer Potency Against MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Int. J. Nanomedicine*, 2022, vol. 17, pp. 901–907. doi: 10.2147/IJN.S335848
67. Sun S.-N., Li M.-F., Yuan T.-Q., Xu F., Sun R.-C. Effect of ionic liquid/organic solvent pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corncob for bioethanol production. Part I: Structural characterization of the lignins. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 43, pp. 570–577. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.074
68. Suzuki S., Miyayama M. Structural Distortion in MnO₂ Nanosheets and Its Suppression by Cobalt Substitution. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, vol. 7, no. 10: 295. doi: 10.3390/nano7100295
69. Svirska S., Grytsyk A. Investigation of tannins in Anchusa officinalis L. *Pharma Innovation*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 758–761.
70. Taleb F., Ammar M., Mosbah M.B., Salem R.B., Moussaoui Y. Chemical modification of lignin derived from spent coffee grounds for methylene blue adsorption. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 11048. doi: 10.1038/s41598-020-68047-6
71. Vashistha V.K., Gautam S., Bala R., Kumar A., Das D.K. Transition Metal-Based Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agents. *Reviews and Advances in Chemistry*, 2022, vol. 12, no. 4, pp. 222–247.
72. Xia H.-Y., Li B.-Y., Zhao Y., Han Y.-H., Wang S.-B., Chen A.-Z., Kankala R.K. Nanoarchitected manganese dioxide (MnO₂)-based assemblies for biomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, vol. 464: 214540. doi: 10.1016/j.ccr.2022.214540
73. Zhang H., Ma Z.F. Phytochemical and Pharmacological Properties of Capparis spinosa as a Medicinal Plant. *Nutrients*, 2018, vol. 10, no. 2: 116. doi: 10.3390/nu10020116

Авторы:

Эльхарриф М.Г., PhD, кафедра фундаментальных медицинских наук, Медицинский колледж, Университет Шахра, Шахра, Саудовская Аравия;

Хасан Н.А., PhD, отдел синтеза, кафедра фотохимии, Научно-исследовательский институт химической промышленности, Национальный исследовательский центр, Каир, Египет;

Шараф М., PhD, кафедра биохимии и молекулярной биологии, колледж наук о морской жизни, Океанский университет Китая, Циндао, Китай.

Authors:

Elharrif M.G., PhD, Department of Basic Medical Sciences, College of Medicine, Shaqra University, Shaqra, Saudi Arabia;

Hassan N.A., PhD, Synthetic Unit, Department of Photochemistry, Chemical Industries Research Institute, National Research Centre, Cairo, Egypt;

Sharaf M., PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, China.

Поступила в редакцию 29.01.2024
Отправлена на доработку 08.03.2024
Принята к печати 06.04.2024

Received 29.01.2024
Revision received 08.03.2024
Accepted 06.04.2024

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ КОММЕРЧЕСКИХ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА БРУЦЕЛЛЫ

Н.В. Жаринова, Н.С. Сердюк, Е.Б. Жилченко, М.Г. Карапетян, О.Н. Белозерова

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Болезнетворные микроорганизмы, в частности *Brucella* spp., представляют серьезную угрозу здоровью человека и животных. В комплексе противоэпидемических и санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на профилактику инфекционных заболеваний, важную роль играет химическая дезинфекция. Этот метод дезинфекции является одним из эффективных, надежных и распространенных способом борьбы с патогенными биологическими агентами. Важная роль отводится современным дезинфицирующим средствам на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС). По отношению к химическим дезинфицирующим средствам возбудитель бруцеллеза относится к группе малоустойчивых микроорганизмов. Выраженной бактерицидной активностью по отношению к бруцеллам обладают растворы сулемы, креолина, фенола, серной, соляной, азотной и уксусной кислот, формалина, хлорамина, перекиси водорода, растворы дезинфицирующих средств на основе ЧАС, триамина и полигексаметиленгуанидина (ПГМГХ). Однако в инструкциях к коммерческим дезинфицирующим препаратам упоминается бактерицидная активность к возбудителям особо опасных инфекций (чума, туляремия, холера и сибирская язва), но не отмечены антимикробные свойства в отношении бруцелл. Целью работы было определение антимикробных свойств пяти коммерческих дезинфектантов: «Альфадез форте», «Аминаз-Плюс», «Велтолен», «Дезарин» и «Лайна-мед», применяемых при обеззараживании объектов при особо опасных инфекциях бактериальной этиологии. Исследования проводили суспензионным методом, согласно руководству «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности». В качестве тест-штаммов применяли три вакцинных штамма *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 VA, *B. suis* 61. В результате проведенных исследований было установлено, что коммерческие дезинфицирующие препараты «Альфадез форте», «Аминаз-Плюс», «Велтолен», «Дезарин» и «Лайна-мед» в концентрациях, предложенных производителями в инструкциях для использования при работе с особо опасными инфекциями (чума, туляремия, холера) обладают бактерицидными свойствами относительно вакцинных штаммов.

Ключевые слова: дезинфицирующие средства, *Brucella* spp., тест-культуры, бактерицидная активность, антимикробная активность, дезинфектанты, дезинфекция.

Адрес для переписки:

Карапетян Маня Григорьевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (988) 766-91-29.
E-mail: manya.karapetyan.ncfu@gmail.com

Contacts:

Manya G. Karapetyan
355035, Russian Federation, Stavropol, Soviet str., 13-15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (988) 766-91-29.
E-mail: manya.karapetyan.ncfu@gmail.com

Для цитирования:

Жаринова Н.В., Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Карапетян М.Г.,
Белозерова О.Н. Изучение бактерицидного действия коммерческих
дезинфицирующих средств на бруцеллы // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 5. С. 1017–1020. doi: 10.15789/2220-7619-STB-17628

Citation:

Zharinova N.V., Serdyuk N.S., Zhilchenko E.B., Karapetyan M.G.,
Belozorova O.N. Studying the bactericidal effect of commercial
disinfectants on brucella // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 1017–1020.
doi: 10.15789/2220-7619-STB-17628

STUDYING THE BACTERICIDAL EFFECT OF COMMERCIAL DISINFECTANTS ON BRUCELLA

Zharinova N.V., Serdyuk N.S., Zhilchenko E.B., Karapetyan M.G., Belozyorova O.N.

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Pathogens, particularly *Brucella* spp., pose a serious threat to human and animal health. In the complex of anti-epidemic and sanitary-hygienic measures aimed at preventing infectious diseases, chemical disinfection plays an important role. This disinfection method is one of the effective, reliable and common ways to combat pathogenic biological agents. An important role is played by modern quaternary ammonium compounds (QAC)-based disinfectants. In relation to chemical disinfectants, the causative agent of brucellosis belongs to the group of low-resistant microorganisms. Solutions of sublimate, creolin, phenol, sulfuric, hydrochloric, nitric and acetic acids, formalin, chloramine, hydrogen peroxide, solutions of disinfectants based on QAC, triamine and polyhexamethylene guanidine (PHMG) have pronounced bactericidal activity against brucellae. However, the instructions for commercial disinfectants note a bactericidal activity against pathogens of particularly dangerous infections (plague, tularemia, cholera and anthrax), but do not indicate antimicrobial properties against *Brucella*. The purpose of the work was to determine the antimicrobial properties of five commercial disinfectants “Alfalez Forte”, “Aminaz-Plus”, “Veltolen”, “Desarin” and “Laina-med”, used in the disinfection of objects with especially dangerous infections of bacterial etiology. The studies were carried out using the suspension method, according to the manual “Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their effectiveness and safety”. Three vaccine strains *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 BA, *B. suis* 61 were used as test microbes. As a result of the studies, it was found that commercial disinfectants “Alfalez Forte”, “Aminaz-Plus”, “Veltolen”, “Desarin” and “Lina-med” in the concentrations proposed by the manufacturers in the instructions for use when working with particularly dangerous infections (plague, tularemia, cholera) have bactericidal properties relative to vaccine strains.

Key words: disinfectants, *Brucella* spp., test cultures, bactericidal activity, antimicrobial activity, disinfectants, disinfection.

Введение

Болезнетворные микроорганизмы, в частности *Brucella* spp., представляют серьезную угрозу здоровью человека и животных. В комплексе противоэпидемических и санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на профилактику инфекционных заболеваний, важную роль играет химическая дезинфекция. Этот метод дезинфекции является одним из эффективных, надежных и распространенных способов борьбы с патогенными биологическими агентами. К началу 90-х гг. XX в. в России был ограничен ассортимент дезинфицирующих средств. Для целей медицинской дезинфекции использовались в основном средства на основе хлорактивных соединений, перекись водорода, спирт, фенольные соединения, формальдегид. В настоящее время ситуация изменилась. Важная роль отводится современным дезинфицирующим средствам на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) [3, 4, 5, 6, 8]. В лечебных учреждениях и бактериологических лабораториях по-прежнему часто применяют перекись водорода и хлорсодержащие дезинфицирующие препараты как относительно недорогие и надежные средства. Однако совместное использование этих дезинфектантов опасно и запрещено (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Ежегодно выпускаются новые дезинфектанты, разрабатываются мультикомплексные рецептуры с выраженными полифункциональ-

ными свойствами, широким спектром бактерицидной активности [4, 7].

По отношению к химическим дезинфицирующим средствам возбудитель бруцеллеза относится к группе малоустойчивых микроорганизмов. Выраженной бактерицидной активностью по отношению к бруцеллам обладают растворы сулемы, креолина, фенола, серной, соляной, азотной и уксусной кислот, формалина, хлорамина, перекиси водорода, растворы дезинфицирующих средств на основе ЧАС, триамина и полигексаметиленгуанидина (ПГМГХ). Однако в инструкциях к коммерческим дезинфицирующим препаратам упоминается бактерицидная активность к возбудителям особо опасных инфекций (чума, туляремия, холера и сибирская язва), но не отмечены антимикробные свойства в отношении бруцелл [1, 2, 9].

Цель исследований — определение бактерицидных свойств некоторых коммерческих дезинфицирующих средств в отношении возбудителя бруцеллеза.

Материалы и методы

В работе использовались коммерческие дезинфицирующие препараты «Альфазед форте», «Аминаз-Плюс», «Велтолен», «Дезарин», «Лайна-мед», которые использовались нами при работе с особо опасными инфекциями (чума, туляремия, холера).

В качестве действующих веществ (ДВ) в состав средства «Альфазед форте» входит комплекс ЧАС: бензалкония хлорид и дидецилдимети-

ламмония хлорид — 12%, глутаровый альдегид (ГА) 4%, глиоксаль — 8%, рН 4,0–6,0. Средство «Аминаз-Плюс» в качестве действующих веществ содержит N,N-бис-(3-аминопропил) додециламин 6%, дидецилдиметиламмония хлорид 8%, смесь алкилдиметилбензиламмония хлорида и алкилдиметилэтилбензиламмония хлорида суммарно 3%, полимер полигексаметиленгуанидин 2,5%, 2-пропанол 5%, ферменты (амилаза, протеаза, липаза), рН 9,0±2,0. Препарат «Велтолен» в качестве ДВ содержит клатрат четвертичного аммониевого соединения с карбамидом (20%), рН 7,3–8,3. «Дезарин» в качестве ДВ содержит N,N-бис-(3-аминопропил) додециламин 2,5%, дидецилдиметиламмония хлорид 2,5%, смесь алкилдиметилбензиламмония хлорида, алкилдиметилэтилбензиламмония хлорида суммарно 2,8%, полимер полигексаметиленгуанидин 1%, рН 7±2. «Лайна-мед» в качестве ДВ содержит смесь ЧАС: алкилдиметилбензиламмония хлорид 6%, дидецилдиметиламмония хлорид 6%, додецилдипропилентриамин 9,6%, рН 9,0±1,0.

В качестве тест-штаммов использовали вакцинные штаммы *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 VA, *B. suis* 61.

Работу проводили в боксе микробиологической безопасности II В2 класса. Исследования выполняли согласно руководству «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности».

Для определения антимикробной активности коммерческих дезинфицирующих средств в отношении бруцелл применяли суспензионный метод. Двухсуточную культуру вакцинных штаммов смывали с поверхностей скошенного бруцеллагара 0,9%-м раствором натрия хлорида, довели до концентрации 1×10^9 м.к./мл. Растворы дезинфицирующих средств готовили на стерильной водопроводной воде непосредственно перед постановкой эксперимента. Растворы разливали по 4,5 мл в стерильные пробирки, добавляли по 0,5 мл взвеси бруцелл, тщательно перемешивали. Через определенные интервалы времени (30 мин, 60 мин) 0,5 мл взвеси (тест-штамм + дезинфицирующее средство) добавляли к 4,5 мл 0,9%-м раствора натрия хлорида, тщательно перемешивали, оставляли на 5 мин. По 0,5 мл вносили в пробирку с 4,5 мл стерильной питье-

вой воды, затем из этой пробы по 0,1 мл вносили в пробирки с 5 мл эритроит-бульона и на поверхность плотной питательной среды (бруцеллагар). Для контроля использовали стерильную водопроводную воду. Посевы инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 0,05^\circ\text{C}$. Результаты исследований оценивали по наличию или отсутствию роста микроорганизмов на чашках Петри через 48, 72, 96, 120 ч. Бактерицидное действие дезинфицирующего средства оценивали по отсутствию видимого роста тест-культур в период всего исследования, при наличии типичного роста бруцелл в контроле.

Результаты и обсуждение

В нашем эксперименте была определена антимикробная активность пяти коммерческих дезинфицирующих препаратов в концентрациях, предложенных в инструкциях производителей для обеззараживания объектов при особо опасных инфекциях бактериальной этиологии (чума, туляремия, холера). Время экспозиции было выбрано также согласно инструкциям к применению используемых коммерческих дезинфектантов. В результате анализа полученных данных установлено, что коммерческие дезинфицирующие средства в различных концентрациях: «Альфадез форте» (0,3%; 0,5%; 1,0%), «Аминаз-Плюс» (0,2%, 0,4%), «Велтолен» (0,25%; 0,5%) «Дезарин» (0,2%; 0,4%) и «Лайна-мед» (0,1%; 0,2%; 0,5%), обладали бактерицидной активностью в отношении вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 VA, *B. suis* 61. В контроле наблюдался рост бруцелл начиная с 48 часов.

Заключение

Таким образом, при проведении экспериментальных исследований установлено, что коммерческие дезинфицирующие препараты «Альфадез форте», «Аминаз-Плюс», «Велтолен», «Дезарин», «Лайна-мед» в концентрациях, предложенных производителями в инструкциях для использования при работе с возбудителями особо опасных инфекций (чума, туляремия, холера) обладают бактерицидными свойствами относительно вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 VA, *B. suis* 61.

Список литературы/References

- Афиногенов Г.Е., Краснова М.В., Афиногенова А.Г. Сравнение методов оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков // Дезинфекционное дело. 2008. № 5. С. 40–44. [Afinogenov G.E., Krasnova M.V., Afinogenova A.G. Comparison of methods for evaluating the effectiveness of disinfectants and antiseptics. *Dezinfektsionnoe delo = Disinfection Affairs*, 2008, no. 4, pp. 40–44. (In Russ.)]
- Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины — дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс, 2009. 303 с. [Vointseva I.I., Gembitskiy P.A. Polyguanidines — disinfectants and multifunctional additives in composite materials. *Moscow: LKM-Press*, 2009. 303 p. (In Russ.)]

3. Очиров О.С., Бурасова Е.Г., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Окладникова В.О., Могнонов Д.М. Антимикробная активность производных полигексаметиленгуанидина гидрохлорида по отношению к мультирезистентным штаммам микроорганизмов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 193–196. [Ochirov O.S., Burasova E.G., Stelmakh S.A., Grigorieva M.N., Okladnikova V.O., Mognonov D.M. Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine hydrochloride derivatives in relation to multi-resistant strains of microorganisms. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 193–196. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AAO-1751
4. Палий А.П., Сеница Е.В., Дубин Р.А., Ведмидь А.В., Палий А.П. Изучение показателей бактерицидности дезинфектантов серии «Неодез» // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2016. № 6 (140). С. 108–111. [Paliy A.P., Sinitza E.V., Dubin R.A., Vedmid A.V., Paliy A.P. The study of bacteriocidity indicators of disinfectants of the Neodez series. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University*, 2016, no. 6 (140), pp. 108–111. (In Russ.)]
5. Пономаренко Д.Г., Скударева О.Н., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Жаринова И.В., Даурова А.В., Германова А.Н., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Манин Е.А., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Бруцеллез: тенденции развития ситуации в мире и прогноз на 2022 г. в Российской Федерации // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 2. С. 36–45. [Ponomarenko D.G., Skudareva O.N., Khachaturova A.A., Lukashevich D.E., Zharinova I.V., Daurova A.V., Germanova A.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Manin E.A., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. Brucellosis: trends in the development of the situation in the world and forecast for 2022 in the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, no. 2, pp. 36–45. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45
6. Спиридонов В.А., Андрус В.Н., Елизаров В.В. Эффективность некоторых дезинфицирующих средств при обеззараживании поверхностей и изделий медицинского назначения, контаминированных потенциально опасными биологическими агентами бактериальной природы категории А // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 102. С. 36–45. [Spiridonov V.A., Andrus V.N., Elizarov V.V. Effectiveness of some disinfectants in disinfection of surfaces and medical devices contaminated with potentially dangerous biological agents of bacterial nature of category A. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2009, no. 102, pp. 36–45. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-37-39
7. Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В., Благодравова А.С., Широкова И.Ю., Кулюкина А.А. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы // Медицинский альманах. 2012. Т. 3, № 22. С. 122–125. [Shkarin V.V., Saperkin N.V., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Shirokova I.Yu., Kulyukina A.A. The regional monitoring of microorganisms resistance to disinfectants: results and perspectives. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2012, vol. 3, no. 22, pp. 122–125. (In Russ.)]
8. Albert M., Feiertag P., Hayn G. Structure-activity relationships of oligoguanidines influence of counterion, diamine, and average molecular weight on biocidal activities. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, pp. 1811–1817. doi: 10.1021/bm0342180
9. Cloete T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, vol. 51, iss. 4, pp. 277–282. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00042-8

Авторы:

Жаринова Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Сердюк Н.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Жилченко Е.Б., к.б.н., зав. лабораторией «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Карапетян М.Г., биолог лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Белозерова О.Н., биолог лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Zharinova N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms”, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Serdyuk N.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms”, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Zhilchenko E.B., PhD (Biology), Head of the Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms”, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Karapetyan M.G., Biologist, Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms”, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Belozyorova O.N., Biologist, Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms”, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation.

ОЦЕНКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА 2019 ГОД. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ

Р.С. Аракельян^{1,2}, С.Ф. Карпенко¹, Ю.И. Расевич¹, П.Э. Исмаилов¹

¹ ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Астрахань, Россия

² ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области, г. Астрахань, Россия

Резюме. *Введение.* Эпидемиологические исследования указывают на серьезную эпидемическую ситуацию, связанную с корью, что подтверждается регистрацией 3251 случая в 64 регионах России за первые полгода 2019 г. Цель исследования: проведение ретроспективного многоцентрового анализа заболеваемости коревой инфекцией среди взрослого населения Астраханской области за 2019 г. *Материалы и методы.* За 2019 г. на территории Астраханской области зарегистрировано 232 эпизода коревой инфекции, на долю взрослого населения пришлось 64 эпизода (27,6%). Превалирующее число случаев заболеваний коревой инфекцией среди взрослых зарегистрировано в медицинских учреждениях, расположенных в городской среде — 43 эпизода (67,2%). *Результаты и обсуждение.* Наибольший процент выявления кори был отмечен в Приволжском районе Астраханской области — 28,7%. Наримановский район также имеет высокий показатель заболеваемости корью — 33,4%. Наиболее неблагоприятная эпидемиологическая обстановка по заболеваемости корью сложилась в Советском районе г. Астрахань. Показатель заболеваемости составил 58,0%, что соответствует 25 случаям коревой инфекции. Среди организованного населения было зарегистрировано 92,2% случаев кори, что составляет 59 эпизодов. Эпизоды коревой инфекции с осложнениями были зарегистрированы в 25,0% случаев (16 эпизодов). Во всех 16 случаях осложнением кори была пневмония. Следует отметить, что горячие точки заболевания коревой инфекцией среди взрослого населения также обнаружены в различных регионах нашей страны. Согласно проведенному тщательному анализу заболеваемости корью, в Республике Северная Осетия — Алания за период с 2018 по 2019 гг. было зафиксировано резкое увеличение числа заболевших. Это явление можно объяснить низким уровнем вакцинации и ревакцинации среди населения. *Заключение.* В 2019 г. в Астраханской области среди взрослого населения была зафиксирована вспышка коревой инфекции, в ходе которой было зарегистрировано 64 случая заболевания. Наиболее подверженным коревой инфекции оказалось городское организованное население. В 25,0% случаев (16 эпизодов) коревая инфекция была осложнена пневмонией. Вакцинация остается основным средством профилактики коревой инфекции.

Ключевые слова: эпидемиология, заболеваемость, корь, взрослое население, профилактика, дети, сыпь.

Адрес для переписки:

Аракельян Рудольф Сергеевич
414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121,
ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 927 281-27-86.
E-mail: rudolf_astraخان@rambler.ru

Contacts:

Rudolf S. Arakelyan
414000, Russian Federation, Astrakhan, Bakinskaya str., 121,
Astrakhan State Medical University.
Phone: +7 927 281-27-86.
E-mail: rudolf_astraخان@rambler.ru

Для цитирования:

Аракельян Р.С., Карпенко С.Ф., Расевич Ю.И., Исмаилов П.Э. Оценка заболеваемости корью взрослого населения Астраханской области за 2019 год. Ретроспективный анализ // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 1021–1025. doi: 10.15789/2220-7619-MMA-17605

Citation:

Arakelyan R.S., Karpenko S.F., Rasevich Yu.I., Ismailov P.E. 2019 measles morbidity assessment in adult population of the Astrakhan region. A retrospective analysis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i mmunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 1021–1025. doi: 10.15789/2220-7619-MMA-17605

2019 MEASLES MORBIDITY ASSESSMENT IN ADULT POPULATION OF THE ASTRAKHAN REGION. A RETROSPECTIVE ANALYSIS

Arakelyan R.S.^{a,b}, Karpenko S.F.^a, Rasevich Yu.I.^a, Ismailov P.E.^a

^a Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russian Federation

^b Center of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan Region, Astrakhan, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Epidemiological studies point at a serious epidemic situation related to measles confirmed by 3251 cases recorded in 64 regions of Russia within the first six months of 2019. The aim of the study was to conduct a retrospective multicenter analysis of 2019 measles morbidity in adult population of the Astrakhan region. *Materials and methods.* In 2019, 232 episodes of measles infection were recorded in the Astrakhan region. Of this, the adult population accounted for 27.6% or 64 episodes. The prevailing number of measles infections among adults was recorded in urban medical institutions — 67.2% or 43 episodes. *Results and discussion.* The top percentage of measles detection was observed in the Volga regions of the Astrakhan region — 28.7%. Narimanovsky district also had a high rate of 33.4%. The most unfavorable epidemiological morbidity was developed in the Sovetsky district of city of Astrakhan, with incidence rate reaching 58.0% or 25 of measles episodes. 92.2% of measles cases were recorded in the organized population, which is 59 episodes. Episodes of measles infection with 25.0% cases all complicated with pneumonia or 16 episodes were recorded in the Astrakhan region. It should be noted that the hot spots of measles infection in adult population are also found in various regions of our country. According to a thorough analysis on measles incidence in the Republic of North Ossetia-Alania within the period from 2018 to 2019, a sharp outbreak in morbidity level was observed over the past year. This phenomenon can be explained by the low population vaccination and revaccination level. *Conclusion.* In 2019, an outbreak of measles infection was recorded in adult population in the Astrakhan region coupled to 64 cases of the disease. In particular, most susceptible to measles were associated with urban environment and the organized population. At the same time, it was noted that in 25.0% of cases, or 16 episodes, measles infection led to complications such as pneumonia. Vaccination remains the essential means of preventing measles infection.

Key words: *epidemiology, morbidity, measles, adult population, prevention, children, rash.*

Введение

Корь — острое инфекционное заболевание, которое долгое время считалось преимущественно детским, — недавно стала вызывать все большую тревогу среди взрослого населения. Эпидемиологические исследования показывают рост числа случаев кори среди взрослых, что создает необходимость повышенного контроля и принятия соответствующих мер по предотвращению распространения заболевания [3].

Эпидемиологические исследования указывают на серьезную эпидемическую ситуацию, связанную с корью, что подтверждается регистрацией 3251 случай в 64 регионах России за первое полугодие 2019 г. [4].

Одна из основных причин возникновения эпидемий кори среди взрослого населения — низкий охват вакцинацией. В отличие от детей, которым прививки обычно проводятся в обязательном порядке, взрослые зачастую остаются неиммунизированными от кори. Более того, некоторые люди могут потерять иммунитет к кори со временем или из-за других факторов, таких как беременность или иммунодепрессия. Это делает их более подверженными инфекции и способствует распространению заболевания в обществе [5].

Клинические проявления кори у взрослых отличаются от симптомов, наблюдаемых у детей. Основные симптомы кори у взрослых включают высокую температуру, кашель, насморк и конъюнктивит. Пациенты также могут

испытывать слабость, головную боль и потерю аппетита [9].

Однако клиническая картина кори у взрослых может быть более разнообразной и менее характерной. У некоторых пациентов могут возникнуть атипичные симптомы, такие как головные боли или диарея. Иногда корь может протекать без явных признаков высыпаний на коже [8, 11].

Борьба с корью достигла прорыва благодаря созданию и использованию вакцин. После принятия стратегического плана по борьбе с этой инфекцией особое внимание было уделено глобальной цели снижения смертности от кори и искоренения заболевания в разных частях мира, включая Европу [10].

Несмотря на значительные успехи, корь по-прежнему представляет серьезную угрозу для непривитых детей и взрослых. Ее способность распространяться остается неизменной, поэтому необходимы дальнейшие усилия в борьбе с ней [7].

Цель исследования — провести ретроспективный многоцентровой анализ заболеваемости коревой инфекцией среди взрослого населения Астраханской области за 2019 г.

Материалы и методы

За 2019 г. на территории Астраханской области зарегистрировано 232 эпизода коревой инфекции. При этом на долю взрослого населения пришлось 64 случая (27,6%).

Анализ данных осуществлялся путем обработки статистических форм заболеваемости, предоставленных ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области».

Превалирующее число случаев заболевания коревой инфекцией среди взрослых зарегистрировано в медицинских учреждениях, расположенных в городской среде — 67,2%, или 43 эпизода.

Статистическая обработка результатов проводилась методами вариационной статистики при помощи пакета стандартизованной программы BioStat Professional 5.8.4. и Microsoft Office «Excel» (Microsoft, США). Данные представлены в виде средней арифметической (M) с учетом ошибки среднего (m) и относительных величин (%).

Результаты и обсуждение

На территории Астраханской области в 2019 г. было зарегистрировано 232 случая коревой инфекции. Из них 64 случая пришлось на взрослое население, что составляет 27,6% от общего числа (табл. 1).

В сельских районах Астраханской области ситуация по заболеваемости взрослого населения демонстрирует следующие показатели (табл. 2).

Наибольший процент выявления кори был отмечен в Приволжском районе Астраханской области — 28,7%. Наримановский район также имеет высокий показатель — 33,4%. Данная информация подтверждается представленной таблицей.

Как уже было отмечено ранее, наибольший процент коревой инфекции выявлен в городской среде — 67,2% (43 эпизода) (табл. 3).

Наиболее неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по заболеваемости сложилась в Советском районе г. Астрахань. Показатель заболеваемости составил 58,0%, что соответствует 25 случаям коревой инфекции.

Среди организованного населения было зарегистрировано 92,2% случаев кори, что составляет 59 эпизодов.

Взрослые сталкиваются с рядом осложнений, связанных с корью. Наиболее тяжелые среди них это слепота, менингиты, менингоэнцефалиты и полиневриты. Также возможно развитие коревого энцефалита, который вызывает отек головного мозга. Встречается он в 1–2 случаях на 1000 заболевших взрослых. Корь также может привести к ларингиту и ларинготрахеиту, вызывающим ложный круп, чаще всего у детей. Пневмония также является осложнением кори, что увеличивает период изоляции до 10 дней. Отит, активизация течения туберкулеза, потеря плода у беременных женщин, энцефалопатия

Таблица 1. Заболеваемость коревой инфекцией на территории Астраханского региона за 2019 г.

Table 1. The 2019 measles morbidity in the Astrakhan region

Население Population	Астраханская область Astrakhan region	г. Астрахань Astrakhan	Всего Total
Взрослые Adults	21	43	64
Дети Children	42	126	168

у 1 из 300 детей и тяжелая диарея — все эти проблемы связаны с корью [2, 6].

На территории Астраханской области были зарегистрированы эпизоды коревой инфекции с осложнениями в 25,0% случаев (16 эпизодов). Все эти эпизоды осложнились пневмонией.

Специфического лечения для кори нет, поэтому единственным и наиболее эффективным способом предотвращения заболевания является вакцинация. Коровая вакцина является мягким и безопасным препаратом, поэтому список противопоказаний к ее проведению очень

Таблица 2. Сельская заболеваемость коревой инфекцией за 2019 г.

Table 2. 2019 Rural measles morbidity

Населенный пункт Population center	Случаи коревой инфекции Cases of measles infection	
	Всего, чел. Total, people	Экстенсивность, % Prevalence, %
Ахтубинский Akhtubinsky	1	4,8
Володарский Volodarsky	4	18,9
Енотаевский Enotaevsky	–	–
Икрянинский Ikryaninsky	–	–
Камызякский Kamyzyaksky	–	–
Красноярский Krasnoyarsky	2	9,4
Лиманский Limansky	1	4,8
Наримановский Narimanovsky	7	33,4
Приволжский Privolzhsky	6	28,7
Харабалинский Kharabalinsky	–	–
Черноярский Chernoyarsky	–	–
ЗАТО г. Знаменск Znamensk	–	–
Всего Total	21	100

Таблица 3. Городская заболеваемость коревой инфекцией за 2019 г.

Table 3. 2019 Urban measles morbidity

Городской район Urban district	Случаи коревой инфекции Cases of measles infection	
	Всего, чел. Total, people	Всего, чел. Total, people
Советский Soviet	25	58,0
Кировский Kirovsky	7	16,3
Трусовский Trusovsky	8	18,5
Ленинский Leninsky	3	7,2
Всего Total	43	100

ограничен. Если более 98% населения привито вакциной, распространение вируса становится невозможным.

Следует отметить, что «горячие точки» заболеваемости коревой инфекцией среди взрослого населения также обнаружены в различных регионах нашей страны. Согласно проведенному тщательному анализу заболеваемости корью в Республике Северная Осетия — Алания за период с 2018 по 2019 гг., было замечено резкое

увеличение числа заболевших за последний год. Это явление можно объяснить низким уровнем вакцинации и ревакцинации среди населения. Ретроспективное исследование также показывает, что существует возрастающая потребность в более эффективной вакцинации населения против кори [1].

Исследование Я.Д. Михайловой также указывает на значительный рост заболеваемости корью по всему миру в 2019 г., достигнув самого высокого уровня за последние 23 года. В России за 11 месяцев этого года было зарегистрировано 3521 случай заболевания. Вспышки кори были зафиксированы в таких регионах, как Москва, Дагестан, Владимирская область, Санкт-Петербург, Екатеринбург и Новосибирск [6].

Заключение

В 2019 г. в Астраханской области среди взрослого населения была зафиксирована вспышка коревой инфекции, в ходе которой было зарегистрировано 64 случая заболевания. Наиболее подверженным коревой инфекции оказалось городское организованное население. В 25,0% случаев (16 эпизодов) коревая инфекция была осложнена пневмонией. Вакцинация остается основным средством профилактики коревой инфекции.

Список литературы/References

1. Айларова Н.Р., Хестанова М.С. Оценка заболеваемости корью среди взрослого населения РСО-Алания за 2018–2019 гг. // *Colloquium-Journal*. 2019. № 15-3 (39). С. 61–62. [Aylarova N.R., Khestanova M.S. Assessment of the incidence of measles among the adult population of the Republic of North Ossetia for 2018-2019. *Colloquium-Journal*, 2019, no. 15-3 (39), pp. 61–62. (In Russ.)]
2. Головки М.Г., Порядина Г.И., Ларина В.Н. Корь в практике терапевта поликлиники // *Лечебное дело*. 2014. № 4. С. 10–16. [Golovko M.G., Ordina G.I., Larina V.N. Measles in the practice of a polyclinic therapist. *Lechebnoe delo = Lechebnoe delo*, 2014, no. 4, pp. 10–16. (In Russ.)]
3. Голубкова А.А., Платонова Т.А., Харитонов А.Н. Вакцинопрофилактика кори и пути ее оптимизации на завершающем этапе элиминации инфекции // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018. № 4. С. 91–94. [Golubkova A.A., Platonova T.A., Kharitonov A.N. Measles vaccination and ways to optimize it at the final stage of infection elimination. *Tihookeanskiy medicinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 4, pp. 91–94. (In Russ.)] doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.91-94
4. Гушин В.А., Мануйлов В.А., Мазунина Е.П., Клейменов Д.А., Семенов Т.А., Гинцбург А.Л., Ткачук А.П. Иммунологическая память как основа рациональной вакцинопрофилактики населения. Обоснование создания системы сероэпидемиологического мониторинга в России // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2017. № 5. С. 5–28. [Gushchin V.A., Manuilov V.A., Mazunina E.P., Kleymenov D.A., Semenenko T.A., Gintsburg A.L., Tkachuk A.P. Immunological memory as a basis for a wise vaccination strategy. A rationale for introducing a comprehensive seroepidemiological surveillance system in Russia. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2017, no. 5, pp. 5–28. (In Russ.)]
5. Короткова В.А., Хомичук Т.Ф., Щелканов М.Ю. Вопросы эпидемиологического надзора и профилактики кори, краснухи в Приморском крае // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2015. Т. 4, № 62. С. 124–129. [Korotkova V.A., Khomichuk T.F., Shchelkanov M.Yu. Issues of epidemiological surveillance and prevention of measles, rubella in Primorsky Krai. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka = Health. Medical Ecology. Science*, 2015, vol. 4, no. 62, pp. 124–129. (In Russ.)]
6. Макембаева Ж.И. Актуальные проблемы коревой инфекции у взрослых // *Евразийское научное объединение*. 2021. № 6-3 (76). С. 184–189. [Makembayeva Zh.I. Actual problems of measles infection in adults. *EvrAzijskoe nauchnoe ob'edinenie = Eurasian Scientific Association*, 2021, no. 6-3 (76), pp. 184–189. (In Russ.)]
7. Санитарные правила СП 3.1.2952-11. Профилактика кори, краснухи, эпидемического паротита. 2012. 147 с. [Sanitary rules SP 3.1.2952-11 Prevention of measles, rubella, mumps. 2012. 147 p. (In Russ.)]
8. Стецюк О.У., Андреева И.В. Популярные мифы и заблуждения относительно антибиотиков среди практических врачей // *Русский медицинский журнал*. 2014. № 9. С. 684–692. [Stetsyuk O.U., Andreeva I.V. Popular myths and

- misconceptions about antibiotics among practitioners. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2014, no. 9, pp. 684–692. (In Russ.)]
9. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимирова Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // *Инфекция и иммунитет*. 2018. Т. 8, № 3. С. 341–348. [Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 341–348. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348
 10. Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т., Ежлова Е.Б., Мельникова, Дубовицкая Е.Л., Орлова О.С., Басов А.А., Фролов Р.А. Заболеваемость корью в разных возрастных группах в период элиминации инфекции // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017. Т. 94, № 3. С. 18–24. [Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Tikhonova N.T., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Dubovitskaya E.L., Orlova O.S., Basov A.A., Frolov R.A. Measles cases by age group during the elimination of infection. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, vol. 94, no. 3, pp. 18–24. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-3-18-25
 11. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological update: Measles — monitoring European outbreaks, 7 July 2017. Stockholm: ECDC. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-measles-monitoring-european-outbreaks-7-july-2017> (Accessed 31 Aug 2017)

Авторы:

Аракельян Р.С., к.м.н., доцент, доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Астрахань, Россия; врач-паразитолог лаборатории бактериологических и паразитологических исследований ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области, г. Астрахань, Россия;

Карпенко С.Ф., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Астрахань, Россия;

Расевич Ю.И., студентка 5 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Астрахань, Россия;

Исмаилов П.Э., студент 5 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Астрахань, Россия.

Authors:

Arakelyan R.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russian Federation; Parasitologist, Laboratory of Bacteriological and Parasitological Research, Center of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan Region, Astrakhan, Russian Federation;

Karpenko S.F., DSc (Medicine), Professor of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russian Federation;

Rasevich Yu.I., 5th year Student, Faculty of Medicine, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russian Federation;

Ismailov P.E., 5th year Student, Faculty of Medicine, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.02.2024
Принята к печати 08.08.2024

Received 20.02.2024
Accepted 08.08.2024

URINARY TRACT INFECTION BY *STREPTOCOCCUS EQUINUS*: A PEDIATRIC CASE PRESENTATION

C. Seitopoulou^a, M. Stamouli^b, G. Kalliora^c, A. Mourtzikou^d

^a Nikea Prime Care Center, Nikea, Greece

^b Naval and Veterans Hospital of Athens, Athens, Greece

^c National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^d GHNP "Agios Panteleimon", Piraeus, Greece

Abstract. *Streptococcus equinus* is a non-enterococcal group D Streptococcus, Gram positive, non-hemolytic, lactic acid bacterium. The incidence of colonization in humans increases in rural areas, where there is high risk of exposure to animal feces and fermented food products. It is associated with specific diseases, such as osteoarticular infections, meningitis, biliary infections, infective endocarditis and colorectal cancer. A male 10-year-old patient, asymptomatic, without underlying medical conditions, was referred for routine check-up at the Outpatient Pediatric Clinic of the Nikea General Hospital, Piraeus, Greece. According to patient history, he had spent two weeks at a summer camp, where he had direct contact with horses, such as horse riding, horse feeding, watering, horse care, etc. His brother, although he had the same contacts and activities, did not present an infection. Examinations of the eyes, mouth, ears, nose, throat and abdomen were normal. Laboratory tests showed mild leukocytosis (12 000/mm³, with 80% neutrophils) and slightly increased erythrocyte sedimentation rate (30 mm/h). Urinalysis and microscopy revealed bacteriuria by nitrite test and pyuria, so urine cultures were performed (Multistix 10 SG Reagent Strips, Siemens Healthineers). The urine culture grew monomicrobial *S. equinus* > 10⁵ CFU/ml. The bacterium was identified by the RapID™ REMEL ONE identification system (Thermo Fisher Scientific). Antimicrobial susceptibility testing revealed resistance to Clindamycin, Tetracycline, Cefotaxime and high susceptibility to Erythromycin. The patient received treatment with Erythromycin. *Streptococcus equinus* has been isolated from the bowel in approximately 7% of the general population. Urinary tract infections are less common. Risk factors for human colonization are considered living in rural areas and having contact with animal feces. The patient, during his stay at the summer camp, had probably contact with horse feces during the relevant activities and therefore infected.

Key words: *Streptococcus equinus*, monomicrobial, colonization, urinary tract.

ИНФЕКЦИЯ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ, ВЫЗВАННАЯ *STREPTOCOCCUS EQUINUS*: СЛУЧАЙ ИЗ ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Сейтопулу К.¹, Стамули М.², Каллиора Д.³, Мурцику А.⁴

¹ Центр первичной помощи, г. Никея, Греция

² Госпиталь военно-морских сил и ветеранов Афин, Афины, Греция

³ Афинский национальный университет имени Каподистрии, Афины, Греция

⁴ «Агиос Пантелеймон», г. Пирей, Греция

Резюме. *Streptococcus equinus* — неэнтерококковый стрептококк группы D, грамположительная, негемолитическая, молочнокислая бактерия. В сельской местности частота инфицирования людей увеличивается, по-

Адрес для переписки:

Антония Мурцику
Адрес: 18454, Греция, г. Пирей, ул. Мантувалу, 3,
«Агиос Пантелеймон».
Тел.: +302132077000. E-mail: antoniamour@yahoo.com

Contacts:

Antonia Mourtzikou
18454, Greece, Piraeus, Mantouvalou 3, GHNP "Agios Panteleimon".
Phone: +302132077000. E-mail: antoniamour@yahoo.com

Для цитирования:

Сейтопулу К., Стамули М., Каллиора Д., Мурцику А. Инфекция мочевых путей, вызванная *Streptococcus equinus*: случай из педиатрической практики // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 5. С. 1026–1030.
doi: 10.15789/2220-7619-UTI-12110

© Seitopoulou C. et al., 2024

Citation:

Seitopoulou C., Stamouli M., Kalliora G., Mourtzikou A. Urinary tract infection by *Streptococcus equinus*: a pediatric case presentation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 5, pp. 1026–1030. doi: 10.15789/2220-7619-UTI-12110

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-UTI-12110>

скольку там существует высокий риск контакта с фекалиями животных и ферментированными пищевыми продуктами. *Streptococcus equinus* ассоциирована со специфическими заболеваниями, такими как костно-суставные инфекции, менингит, инфекции желчных путей, инфекционный эндокардит и колоректальный рак. Пациент мужского пола 10 лет, с бессимптомным течением и без сопутствующих заболеваний, был направлен на плановый осмотр в амбулаторную педиатрическую клинику больницы общего профиля Никея, Пирей, Греция. Согласно истории болезни, он провел две недели в летнем лагере, где имел непосредственный контакт с лошадьми, например, в ходе верховой езды, кормления и поения лошадей, а также ухода за ними и т. д. Однако инфекция не выявлена у его брата с аналогичными контактами и занятиями. Осмотр глаз, рта, ушей, носа, горла и живота особенностей не выявил. Лабораторные анализы показали умеренный лейкоцитоз ($12\,000/\text{мм}^3$ с 80% нейтрофилов) и незначительное увеличение скорости оседания эритроцитов (30 мм/ч). Анализ мочи и микроскопия выявили бактериурию по нитритному тесту и пиурию, что обусловило проведение посева мочи (Multistix 10 SG Reagent Strips, Siemens Healthineers), где был обнаружен *S. equinus* $> 10^5$ КОЕ/мл. Бактерию идентифицировали с помощью системы идентификации RapID™ REMEL ONE (Thermo Fisher Scientific). Тестирование чувствительности к противомикробным препаратам выявило устойчивость к клиндамицину, тетрациклину, цефотаксиму и высокую чувствительность к эритромицину. Пациент получал лечение эритромицином. *Streptococcus equinus* выделяется из кишечника примерно у 7% людей в общей популяции, а инфекции мочевыводящих путей встречаются реже. Факторами риска колонизации человека считаются проживание в сельской местности и контакт с фекалиями животных. Описанный в настоящем исследовании пациент, пребывавший в летнем лагере, вероятно, контактировал с фекалиями лошадей, что привело к развитию инфекции, вызванной *Streptococcus equinus*.

Ключевые слова: *Streptococcus equinus*, мономикроб, колонизация, мочевыводящие пути.

Introduction

Streptococcus equinus is a non-enterococcal group D *Streptococcus*, which colonizes both humans and animals and is involved in food fermentation. It is a Gram positive, non-hemolytic, lactic acid, bile-esculin positive, non-lactose and non-mannitol fermenting bacterium. It is found predominantly in the alimentary tract of horses, and it is associated with specific diseases, such as osteoarticular infections, meningitis, biliary infections, infective endocarditis and colorectal cancer) (Marmolin et al., 2016; Kaiki et al., 2021; Vinciguerra et al., 2021). The incidence of colonization in humans increases in rural areas, where there is high risk of exposure to animal feces and fermented food products (Kaiki et al., 2021; Vinciguerra et al., 2021). Urinary tract infections are among the most frequent infections worldwide. They are detected in hospital and primary care consultations, and in some cases they are asymptomatic. Timely diagnosis and treatment of urinary tract infections can prevent from serious consequences. Urinary tract infections from *Streptococcus equinus* are very rare. The aim of our study is to present an asymptomatic pediatric case of urinary tract infection by *Streptococcus equinus*, acquired due to leisure time spent with horses.

Case presentation

A 10-year-old male patient, asymptomatic, without underlying medical conditions, was referred for routine check-up to the Outpatient Pediatric Clinic of the Nikea General Hospital, Piraeus, Greece. According to patient history, he had spent

two weeks at a summer camp, where he had direct contact with horses, such as horse riding, horse feeding, watering, horse care etc. His older brother, although he had the same contacts and activities, did not present any infection. Examinations of the eyes, mouth, ears, nose, throat and abdomen were normal. Laboratory tests, such as complete blood count, biochemical tests, urinalysis and urine culture were performed.

Materials and methods

The complete blood count was measured on the NIHON KOHDEN CelltacG hematology analyzer, biochemical tests were measured on the KONELAB 60 biochemistry analyzer, urinalysis was performed by the Multistix 10 SG Reagent Strips (Siemens Healthineers), and the urine cultures were performed on Columbia blood agar. For microbial identification, RapID STR REMEL™ (Thermo Scientific System), Gram stain and agglutination with streptococcal group sera (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) were applied. In addition, the drug susceptibility testing of the urine culture was performed by the Kirby Bauer disk diffusion susceptibility test, by implementing the EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 2023 criteria.

Results


Haematology tests showed mild leukocytosis ($12\,000/\text{мм}^3$ with 80% neutrophils) and slightly increased erythrocyte sedimentation rate (30 mm/h). Biochemical test results were as follows: glucose

86 mg/dL, urea 30.5 mg/dL, uric acid 6.63 mg/dL, creatinine 0.98 mg/dL, GGT 22 U/L, GOT 20 U/L and GPT 22 U/L. Urinalysis and microscopy revealed bacteriuria by nitrite test and pyuria. The urine culture grew monomicrobial *Streptococcus equinus* > 10⁵ CFU/ml. Antimicrobial susceptibility testing revealed resistance to Clindamycin, Tetracycline, Cefotaxime and high susceptibility to Erythromycin. The patient received treatment with Erythromycin and recovered quickly.

Discussion

Equines play an important role in transmitting several zoonotic diseases to humans. The emergence and re-emergence of equine zoonotic pathogens have been described by many authors in the literature. *Streptococcus equinus* has been isolated from the bowel in approximately 7% of the general population. It has rarely been described as a human pathogen. Infections in humans are most often associated with bacteremia, with or without endocarditis (Chayakulkeeree et al., 2015; Marmolin et al., 2016; Jans and Boleij, 2018; Pompilio et al., 2019). Moreover, *Streptococcus equinus* has been detected in food products including fermented milk in sub-Saharan Africa, Asia and Southern Europe, fermented fish in Asia and fermented plants in sub-Saharan Africa and Latin America suggesting a wide range of habitats and its adaptability to different environmental conditions (Khurana et al., 2015; Jans and Boleij, 2018; González-de la Cruz et al., 2021; Öberg et al., 2022). *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC), consists of commensal bacteria, mainly described as colonizers of the rumen, crop, and cloaca of animals and colon of humans, with a fecal carriage rate of SBSEC in humans ranging from 5% to over 60% (Khurana et al., 2015; Öberg

et al., 2022). The variation of the percentage observed, is attributed to different detection techniques and regional differences. Moreover, most studies include specific population groups and not the general population (Jans et al., 2012; Lopes et al., 2014; Dekker and Lau, 2016). Epidemiological data about *Streptococcus equinus* are limited. The rare published cases include infective endocarditis cases (Keerty et al., 2021; Vinciguerra et al., 2021; Öberg et al., 2022; Stummer et al., 2023), bacteremia (Chayakulkeeree et al., 2015; Marmolin et al., 2016; Kaiki et al., 2021; Öberg et al., 2022; Stummer et al., 2023) and one case of endocarditis combined with histiocytosis (Sechi et al., 2000). In 2013 three cases of *Streptococcus equinus* subspecies zooepidemicus were detected in Eastern Finland, in patients who were horse trainers and breeders. It is noteworthy that the disease in all three patients was invasive and severe, requiring prolonged treatment and rehabilitation. Human infections with *Streptococcus equinus* subspecies zooepidemicus, are very rare and are generally associated with contact with horses, and consumption of unpasteurized milk products, goat cheese or pork. In most cases *S. zooepidemicus* leads to fulminant infections (Pelkonen et al., 2013; Stummer et al., 2023). Urinary tract infections are much less common and their role of the SBSEC (*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex) as urinary pathogens is not well known (Matesanz et al., 2015; de Teresa-Alguacil et al., 2016; Rosales-Castillo et al., 2022). In Greece, there are no epidemiological surveillance data from the National Public Health Organization for *Streptococcus equinus* infection, probably due to its rarity. In the recent past, no similar infections have been detected nor published in Greece, concerning any population age group. The patient in this case, during the stay at the summer camp, had probably contact with horse feces during the relevant activities and therefore was



ERIC™ *Electronic RapID Compendium*

Laboratory: My Laboratory
User: admin

Ref No: 23.0000187
Report Date: 1/3/2023

RapID STR

Identification Report

Microcode: 60401

- ARG	- SBL	- GAL	- PO4	+ LYS
+ ESC	- RAF	- GLU	- TYR	- PYR
+ MNL	- INU	+ NAG	- HPR	- HEM

IDENTIFICATION = S.equinus (Gp D)

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
S.equinus (Gp D)	99,99%	1/5	None

Probability Level: Implicit BioFrequency: Typical

Group D non-enterococcus. Only rarely encountered in clinical specimens. Associated with animals.

Figure. Identification of *S. equinus* by RapID™ REMEL ONE

infected. No epidemiological data from the campsite were collected. The child was asymptomatic and the urine culture was performed on the basis of routine testing, so there may be cases of infection which have been under-diagnosed. The 10 year old patient has a higher risk of being infected, due to poor application of hygiene rules in his age group during vacations, without the supervision of parents or teachers. In Greece, horse riding is not a widespread sport and leisure with horses is very limited. Contact with horses occurs in most cases due to agricultural activities. Moreover, a National Equine Registry has not yet been established, despite the continuous efforts of the relevant animal welfare associations (Hellenic Society for the Equine Welfare and Panhellenic Equine Welfare Society). There is an increasing evidence that antibiotic resistance is widespread among *Streptococcus equinus* clinical isolates, with variable resistance rates reported for clindamycin, erythromycin, tetracycline, and levofloxacin (Boyle et al., 2018; Pompilio et al., 2019; Bohlman et al., 2023; Chhabra et al., 2023). Given the increasing infection rates it is of utmost importance to continuously

evaluate the resistance profiles, as well as to determine the factors that enable colonization and establishment in animal and humans, in order to develop strategies to reduce public health risks. The diseases of equines put at risk significant part of the population, such as veterinarians, animal handlers, horse trainers and breeders, animal health personnel, the population of agricultural communities, as well as the general population that gets in contact with horses during sports or leisure time (Bohlman et al., 2023; Chhabra et al., 2023).

Conclusion

Streptococcus equinus is a rare Gram-positive bacterium, that may cause fulminant infection in humans. In this paper we describe a rare asymptomatic pediatric case of urinary tract infection with *S. equinus*, as a result of contact with horses. All clinicians and laboratory physicians should be alert for timely diagnosis and specific therapeutic treatment, aiming to ensure the quality of life of patients and increase their survival expectancy.

References

- Bohlman T., Waddell H., Schumaker B. A case of bacteremia and pneumonia caused by *Streptococcus equi* subspecies *equi* infection in a 70-year-old female following horse exposure in rural Wyoming. *Ann. Clin. Microb. Antimicrob.*, 2023, vol. 22, no. 1: 65. doi: 10.1186/s12941-023-00602-1
- Boyle A.G., Timoney J.F., Newton J.R., Hines M.T., Waller A.S., Buchanan B.R. *Streptococcus equinus* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.*, 2018, vol. 32, no. 2, pp. 633–647. doi: 10.1111/jvim.15043
- Chayakulkeeree M., Nopjaroonsri P., Leelapornand A. Clinical characteristics of group D streptococcal bacteremia in a University Hospital in Thailand. *Open Forum Infect. Dis.*, 2015, vol. 2, no. 1, pp. 831–843. doi: 10.1093/ofid/ofv133.548
- Chhabra D., Bhatia T., Goutam U., Manuja A., Kumar B. Strangles in equines: an overview. *Microb. Pathog.*, 2023, vol. 178: 106070. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106070
- Dekker J.P., Lau A.F. An Update on the *Streptococcus bovis* Group: Classification, Identification, and Disease Associations. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, vol. 54, pp. 1694–1699. doi: 10.1128/JCM.02977-15
- De Teresa-Alguacil J., Gutiérrez-Soto M., Rodríguez-Granger J., Osuna-Ortega A., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez-Fernández J. Clinical interest of *Streptococcus bovis* isolates in urine. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2016, vol. 29, no. 3, pp. 155–158.
- González-de la Cruz J.U., Rodríguez-Palma J.J., Escalante-Herrera K.S., de la Torre Gutiérrez L., Pérez-Morales R., de la Cruz-Leyva M.C. Identificación genética de bacterias ácido lácticas nativas en leche cruda de vaca y queso Poro artesanal. *Manglar*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 7–13. doi: 10.17268/manglar.2021.001
- Jans C., Lacroix C., Meile L. A Novel Multiplex PCR/RFLP Assay for the Identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Members from Dairy Microbial Communities Based on the 16S rRNA Gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, vol. 326, pp. 144–150. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02443.x
- Jans C., Boleij A. The road to infection: host-microbe interactions defining the pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members. *Front Microbiol.*, 2018, vol. 9: 603. doi: 10.3389/fmicb.2018.00603
- Kaiki Y., Kitagawa H., Tadera K., Taogoshi H., Ikeda M., Kano M., Harino T., Nomura T., Omori K., Shigemoto N., Takahashi S., Ohge H. Laboratory identification and clinical characteristics of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex bacteremia: a retrospective, multicenter study in Hiroshima, Japan. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, no. 1: 1192. doi: 10.1186/s12879-021-06880-4
- Keerty D., Yacoub A.T., Nguyen T.C., Haynes E., Greene J. First Case of Infective Endocarditis With *Streptococcus equinus* in an Immunocompetent Patient in North America: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*, 2021, vol. 13, no. 11: e19473. doi: 10.7759/cureus.19473
- Khurana S.K., Dhama K., Prasad M., Karthik K., Tiwari R. Zoonotic pathogens transmitted from equines: diagnosis and control. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 2015, no. 3 (2s), pp. 32–53. doi: 10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.32.53
- Lopes P.G., Cantarelli V.V., Agnes G., Costabeber A.M., d'Azevedo P.A. Novel Real-time PCR Assays Using TaqMan Minor Groove Binder Probes for Identification of Fecal Carriage of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex from Rectal Swab Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, pp. 974–976. doi: 10.1128/JCM.03253-13
- Marmolin E.S., Hartmeyer G.N., Christensen J.J., Nielsen X.C., Dargis R., Skov M.N., Knudsen E., Kemp M., Justesen U.S. Bacteremia with the *bovis* group streptococci: species identification and association with infective endocarditis and with gastrointestinal disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, vol. 85, no. 2, pp. 239–242. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.019

15. Matesanz M., Rubal D., Iñiguez I., Rabuñal R., García-Garrote F., Coira A., García-País M.J., Pita J., Rodriguez-Macias A., López-Álvarez M.J., Alonso M.P., Corredoira J. Is *Streptococcus bovis* a urinary pathogen? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015, vol. 34, no. 4, pp. 719–725. doi: 10.1007/s10096-014-2273-x
16. Öberg J., Nilson B., Gilje P., Rasmussen M., Inghammar M. Bacteraemia and infective endocarditis with *Streptococcus bovis*-*Streptococcus equinus*-complex: a retrospective cohort study. *Infect. Dis.*, 2022, vol. 54, no. 10, pp. 760–765. doi: 10.1080/23744235.2022.2089730
17. Pelkonen S., Lindahl S.B., Suomala P., Karhukorpi J., Vuorinen S., Koivula I., Väisänen T., Pentikäinen J., Autio T., Tuuminen T. Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, vol. 19, no. 7, pp. 1041–1048.
18. Pompilio A., Di Bonaventura G., Gherardi G. An overview on *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex isolates: identification to the species/subspecies level and antibiotic resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 3: 480.
19. Rosales-Castillo A., Jiménez-Guerra G., Ruiz-Gómez L., Expósito-Ruiz M., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez-Fernández J. Emerging Presence of Culturable Microorganisms in Clinical Samples of the Genitourinary System: Systematic Review and Experience in Specialized Care of a Regional Hospital. *J. Clin. Med.*, 2022, vol. 11, no. 5: 1348.
20. Sechi L.A., De Carli S., Ciani R. *Streptococcus equinus* endocarditis in a patient with pulmonary histiocytosis X. *Am. J. Med.*, 2000, vol. 108, no. 6, pp. 522–523. doi: 10.1016/s0002-9343(99)00331-9
21. Stummer M., Frisch V., Glitz F., Hinney B., Spargser J., Krücken J., Diekmann I., Dimmel K., Riedel C., Cavalleri J.V., Rümenapf T., Joachim A., Lyrakis M., Auer A. Presence of Equine and Bovine Coronaviruses, Endoparasites, and Bacteria in Fecal Samples of Horses with Colic. *Pathogens*, 2023, vol. 12, no. 8: 1043.
22. Vinciguerra M., Santamaria V., Romiti S., D’Abramo M., Toto G., De Bellis A., Taliani G., Sangiorgi G., Greco E. Case Report: *Streptococcus alactolyticus* as a Rare Pathogen of Mitral Endocarditis. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, vol. 8: 648213.

Авторы:

Сейтопулу К., д.м.н., магистр в области гигиены труда и окружающей среды, доктор философии, биопатолог, лаборатория биопатологии, Центр первичной медико-санитарной помощи, г. Никея, Греция;

Стамули М., бакалавр, магистр в области управления здравоохранением, магистр всеобщего управления качества, Европейский специалист в области лабораторной медицины, директор лаборатории биохимии, Афинский госпиталь военноморских сил и ветеранов («NNA»), Афины, Греция;

Каллиора Д., студентка биологического факультета Афинского национального университета имени Каподистрии (ЕКРА), Афины, Греция;

Мурцику А., бакалавр, магистр клинической химии, магистр общественного здравоохранения, магистр управления первичной медико-санитарной помощью, Европейский специалист в области лабораторной медицины, к.н., старший научный руководитель лаборатории молекулярной диагностики, GHNP «Агиос Пантелеймон», г. Пирей, Греция.

Authors:

Seitopoulou C., MD, MSc in Occupational and Environmental Health, PhDc, Biopathologist, Laboratory of Biopathology, Nikea Prime Care Center, 2nd YPE, Nikea, Greece;

Stamouli M., BSc, MSc in Health management, MSc in TQM, EurSpLM, Director of Biochemistry Laboratory, Naval and Veterans Hospital of Athens (“NNA”), Athens, Greece;

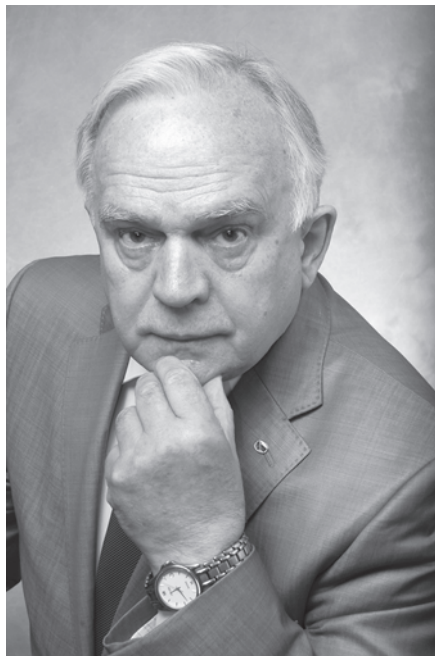
Kalliora G., Student at Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens (EKPA), Athens, Greece;

Mourtzikou A., BSc, MSc in Clinical Chemistry, MPH, MPHMM, EurSpLM, PhD, Scientific Senior Supervisor, Laboratory of Molecular Diagnostics, GHNP “Agios Panteleimon”, Piraeus, Greece.

Поступила в редакцию 24.05.2023
Отправлена на доработку 29.07.2023
Принята к печати 05.03.2024

Received 24.05.2023
Revision received 29.07.2023
Accepted 05.03.2024

К 80-ЛЕТИЮ ВАЛЕРИЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА ЧЕРЕШНЕВА



24 октября 2024 года исполняется 80 лет академику Валерию Александровичу Черешневу — выдающемуся российскому ученому в области фундаментальной и прикладной иммунологии. Основные направления научной деятельности Валерия Александровича говорят о широте взглядов и многогранности его фигуры: экология и иммунитет, иммунофизиология, иммунные механизмы воспаления, стресса, сердечно-сосудистой патологии, опухолей, глазных болезней, СПИД. Своими работами он внес существенный вклад в изучение комбинированных радиационных поражений. Большое значение Валерий Александрович уделяет и практическому применению полученных значимых результатов фундаментальных исследований. Так, В.А. Черешнев с соавторами установил основные закономерности отклонений функционирования иммунной системы, возникающих под влиянием различных экологически неблагоприятных факторов, что позволило разработать методы устранения этих нарушений. Вместе с коллективом исследователей он обосновал принципиально новую концепцию системного воспаления, охарактеризовав его как типовой патологический процесс; концепцию аутоиммунной регуляции гомеостаза; общебиологическую концепцию развития заболеваний, связав этот процесс с нарушением экологических взаимоотношений между макроорганизмом (человек) и микроорганизмами (бактерии, вирусы). На основе фундаментальных исследований В.А. Черешнева, его учеников и коллег в медицинскую практику внедрен ряд инновационных технологий, в частности организовано производство эффективного иммуномодулятора «Профеталь». Препарат применяется для лечения аутоиммунных заболеваний, а также в биотерапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Валерием Александровичем создана известная в России научная школа, к которой принадлежат не только сотрудники его институтов и кафедр, но и широкий круг исследователей в различных областях биологии и медицины. Создана научная школа, получавшая в течение ряда лет (2005–2015 гг.) в результате конкурсного отбора государственную поддержку исследований в рамках грантов Президента РФ.

Черешнев В.А. известен в нашей стране не только как выдающийся ученый, но и как человек, обладающий незаурядными организаторскими способностями. Он организовал и является заведующим кафедрами микробиологии и иммунологии Пермского государственного университета (ныне Пермский государственный национальный исследовательский университет) (с 1994 г.), иммунохимии Уральского государственного технического университета (ныне Уральский Федеральный университет им. первого президента России Б.Н. Ельцина) (с 2000 г.), иммунологии Пермской го-

сударственной медицинской академии им. акад. Е.А. Вагнера (ныне Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера) (с 2008 г.), принимал участие в создании и был профессором кафедры иммунологии на биологическом факультете МГУ им. М. Ломоносова (2010–2020 гг.).

Валерий Александрович Черешнев создал и возглавил вначале Екатеринбургский филиал Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, на базе которого в дальнейшем был создан Институт иммунологии и физиологии (ИИФ) УрО РАН, которым он руководил с 2003 по 2018 г., а сегодня Валерий Александрович — научный руководитель ИИФ УрО РАН.

Под его руководством издаются ведущие журналы страны в области медицины и иммунологии. В.А. Черешнев — главный редактор «Российского иммунологического журнала», «Вестника Уральской медицинской академической науки», Вестника УрО РАН «Наука. Общество. Человек», журнала «Иммунология Урала», он также является членом редколлегий и редакционных советов ряда центральных журналов.

Свои силы и опыт Валерий Александрович вкладывает и в развитие отечественной науки, являясь заместителем президента РАН. Большое внимание уделял развитию и продвижению отечественной иммунологии, 22 года он работал на посту Президента Российского Научного общества иммунологов, а в текущем году избран почетным Президентом общества.

Валерий Александрович — инициатор, организатор и участник многих международных и российских научных форумов, съездов, конгрессов мирового уровня по различным вопросам биологии и медицины. Ученые нашей страны знают его как блестящего лектора с запоминающейся харизмой и ораторским обаянием.

Валерий Александрович воспитал целую плеяду высококлассных специалистов, ставших известными учеными, среди которых доктора наук, профессора, члены-корреспонденты. Под его руководством подготовлено и защищено 35 кандидатских и 53 докторских диссертаций. Он автор и соавтор более 900 научных трудов, в том числе 74 книг и монографий, 2 атласов, 45 учебных изданий, 44 запатентованных изобретений, 2 открытий, 169 общественных публикаций.

О признании таланта Валерия Александровича как ученого и наставника свидетельствует избрание его членом ряда международных академий, в том числе Международной академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности (1994), Европейской академии наук (2002), Всемирной академии наук (2005), Washington Academy of Sciences (2005), The World Academy of Art and Science (2005) и др. В.А. Черешневу присуждено почетное звание «Почетный доктор» ряда передовых российских научных институтов и университетов: Института экспериментальной медицины РАМН (Санкт-Петербург, 2010), Российской Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург, 2013), Санкт-Петербургского Гуманитарного университета профсоюзов (2014), Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета РАН (2016), Санкт-Петербургского государственного университета (2019), Северного Федерального Арктического университет им. М.В. Ломоносова (Архангельск, 2019); он почетный профессор Московского Государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова «HONORIS CAUSA» (ныне Российский университет медицины Минздрава России) (2016), Уральского государственного экономического университета (2017).

Задостижения в научной, научно-организационной и общественной деятельности В.А. Черешнев отмечен орденами «Дружбы», «За заслуги перед Отечеством» IV, III и II степени, «Александра Невского», а также тремя премиями Правительства Российской Федерации.

Все иммунологическое сообщество ценит Валерия Александровича за его человечность, мудрость, доброжелательность и внимательность в отношениях с людьми, неиссякаемую энергию и оптимизм. Желаем Вам, дорогой Валерий Александрович, здорового долголетия, новых научных достижений и много новых талантливых учеников!

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.arpk.org.
 Подписной индекс 41392.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Алиева А.А.	927	Комиссарова Д.В.	951	Степанов А.А.	971
Алутина Э.Л.	927	Копать В.В.	900	Тотоян А.А.	900, 917
Андреева И.С.	961	Костинов М.П.	927	Трулев А.С.	900
Аракельян Р.С.	1021	Краснов А.А.	900	Тюкавкина С.Ю.	927
Балахнова В.В.	927	Кудрявцев И.В.	900	Усанова Н.А.	951
Бачевская А.В.	917	Кузнецова Р.Н.	900	Уткин О.В.	936
Белозерова О.Н.	1017	Кузьмич Е.В.	891	Филатова Е.Н.	936
Бубнова Л.Н.	891	Ларина И.М.	951	Харсеева Г.Г.	927
Васильева Т.П.	981	Ларионова Н.В.	845	Чайкина В.А.	927
Вербицкая Е.В.	981	Мандель И.А.	971	Черепанова Е.А.	917
Волкова В.В.	927	Миличкина А.М.	900	Чирак Е.Л.	900
Галоян А.С.	981	Миличкина Д.М.	917	Чирак Е.Р.	900
Гладких А.С.	917	Минаева С.В.	936	Шарова А.А.	900, 917
Глазанова Т.В.	891	Морозова В.В.	961	Шевела А.И.	971
Губанова А.В.	900	Ошкин С.Е.	881	Шилова Е.Р.	891
Даниленко С.О.	971	Останкова Ю.В.	900	Шедеркина Е.Е.	900
Дедков В.Г.	917	Павлова И.Е.	891	Ali I.	995
Дрозд И.В.	900	Пастушкова Л.Х.	951	Aziz A.	995
Духовинов И.В.	900	Петрова О.А.	900	Derevyanchenko I.A.	862
Евсеев В.А.	881	Попкова М.И.	936	Elharrif M.G.	1002
Жаринова Н.В.	1017	Попова М.Р.	917	Hassan N.A.	1002
Желтухина А.И.	845	Пьянков О.В.	881	Jabbar A.	995
Жилченко Е.Б.	1017	Разумовская А.П.	900	Kalliora G.	1026
Жимбаева О.Б.	900	Расевич Ю.И.	1021	Kraeva L.A.	862
Загдын З.М.	981	Рейнгардт Д.Э.	900	Mourtzikou A.	1026
Зайковская А.В.	881	Рубинштейн А.А.	900	Seitopoulou C.	1026
Замятина Е.В.	971	Рябченкова А.А.	900	Sharaf M.	1002
Зудин А.Б.	981	Савин Т.В.	900	Stamouli M.	1026
Ильин В.К.	951	Саенко А.И.	900	Ullah A.	995
Исмаилов П.Э.	1021	Сахарнов Н.А.	936	Ullah H.	995
Кабанов А.С.	961	Сбарцалья В.А.	917	Ullah I.	995
Карапетян М.Г.	1017	Сварваль А.В.	900	Ullah J.	995
Карпенко С.Ф.	1021	Сердюк Н.С.	1017	Ullah Mati.	995
Каширина Д.Н.	951	Сизов А.А.	971	Ullah Muti.	995
Киселева И.В.	845	Сизов Д.А.	971	Umair M.	995
Кобесов Н.В.	981	Симбирцев А.С.	900		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергический анамнез	971	коронавирусный антиген Cord_PS	900	antibacterial	1002
антимикробная активность	1017	«КоронаДерм-PS»	900	anti-biofilm	1002
антитела	881	корь	1021	anticancer	1002
бактериальные патогены	927	кросс-реактивность	881	antimicrobial resistance	995
бактерицидная активность	1017	микробиом дыхательных путей	927	antimicrobial resistance gene	995
биологические свойства	845	общественное здоровье	981	bacteria	862
бронхолегочная инфекция	961	общий иммуноглобулин Е	971	<i>Brucella</i> spp.	1017
взрослое население	1021	ОРВИ	917	<i>C. spinosa</i>	1002
вирусные патогены	927	пандемия COVID-19	917	<i>Candida albicans</i>	961
вирусы гриппа В	845	паразитарная инвазия	971	<i>Candida utilis</i>	961
ВИЧ-инфекция	936	плотность населения	981	CD4 ⁺ Т-клетки	900
ВЭБ-1	936	протеомика	951	CD8 ⁺ Т-клетки	900
ВЭБ-2	936	профилактика	1021	colonization	1026
гипериммунные сыворотки	881	ПЦР	936	COVID-19	881, 891, 900
грипп	845, 917	реакция нейтрализации	881	<i>Enterococcus</i>	995
дезинфектанты	1017	резистентность к антимикотикам	961	HLA-аллели	891
дезинфекция	1017	респираторные вирусы	917	HLA-гены	891
дезинфицирующие средства	1017	респираторные инфекции	927	honeybees chitosan	1002
дети	927, 1021	связь человека и животного	971	IFN γ	900
доступность медицинской помощи	981	секвенирование	936	<i>L. innocua</i>	862
дрожжеподобные грибы	961	специфический иммуноглобулин		<i>L. monocytogenes</i>	862
заболеваемость	917, 1021	класса G	971	<i>Listeria</i>	862
здравоохранение	981	«сухая» иммерсия	951	listeriosis	862
золотистый стафилококк	951	сыпь	1021	LMP-1	936
зооноз	971	тест-культуры	1017	minimum inhibitory concentration	995
иммуногенетические маркеры	891	Т-клеточный иммунный ответ	900	MnO ₂ NPs	1002
кандидоз	961	туберкулез	981	monomicrobial	1026
кишечная микрофлора	951	тяжесть заболевания	891	pathogenicity	862
кишечная палочка	951	факторы риска	981	SARS-CoV-2	891, 900
клинические изоляты	961	эволюция	845	<i>Streptococcus equinus</i>	1026
коинфекции	917	энтеробактерии	951	urinary tract	1026
коронавирус SARS-CoV-2	881	эпидемиология	1021	vancomycin resistant enterococci	995
				virulence factors	995

Иллюстрации к статье «Биосинтез новых нанокapsул MnO_2 с помощью экстракта *C. spinosa* и хитозана медоносной пчелы: изучение антибактериальных и противораковых свойств» (авторы: М.Г. Эльхарриф, Н.А. Хасан, М. Шараф) (с. 1002–1016)

Illustrations for the article “Biosynthesis of novel MnO_2 nanocapsules via *C. spinosa* extract and honeybee-derived chitosan: exploring antibacterial and anticancer properties” (authors: Elharrif M.G., Hassan N.A., Sharaf M.) (pp. 1002–1016)

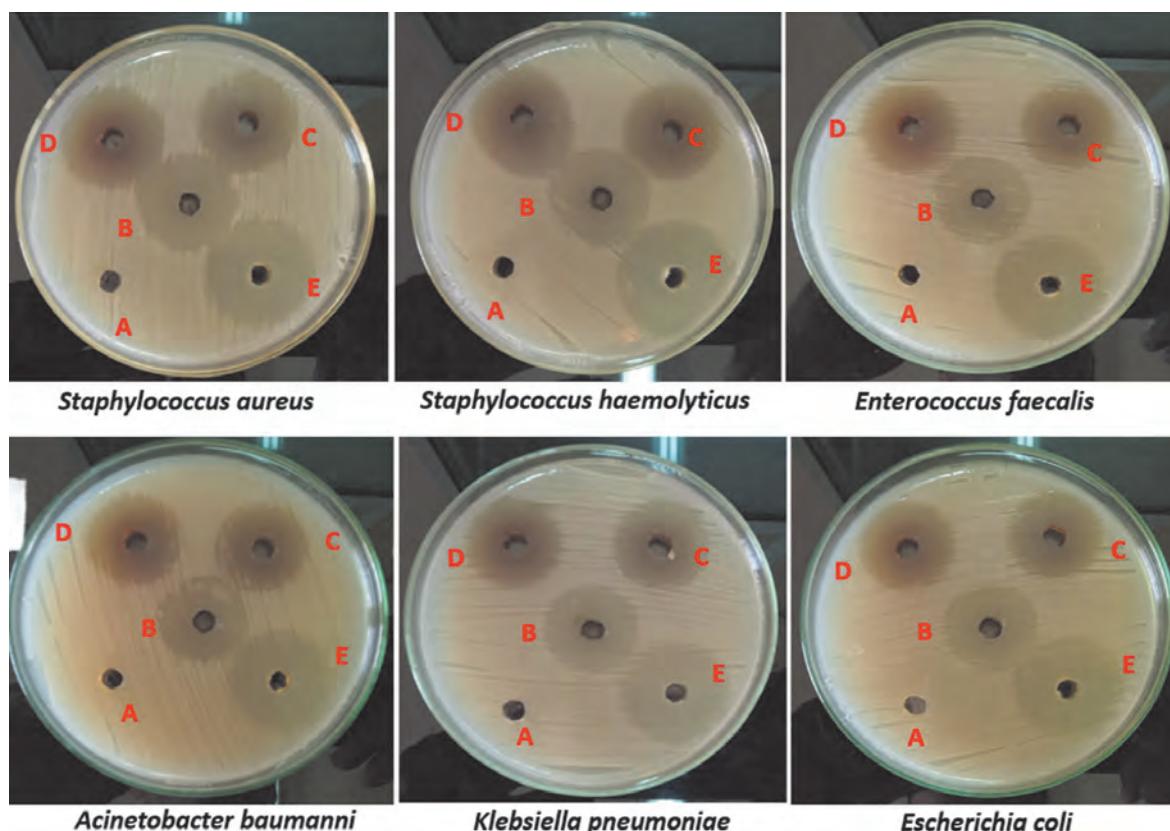


Figure 4. The inhibition zone of different pathogenic bacteria strains *S. aureus*, *S. hominis*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *E. coli* against by (A) negative control (dH_2O), (B) positive control, (C) SCLe, (D) SCLe@ MnO_2 NPs, and (E) CSH/SCLe@ MnO_2 NPs

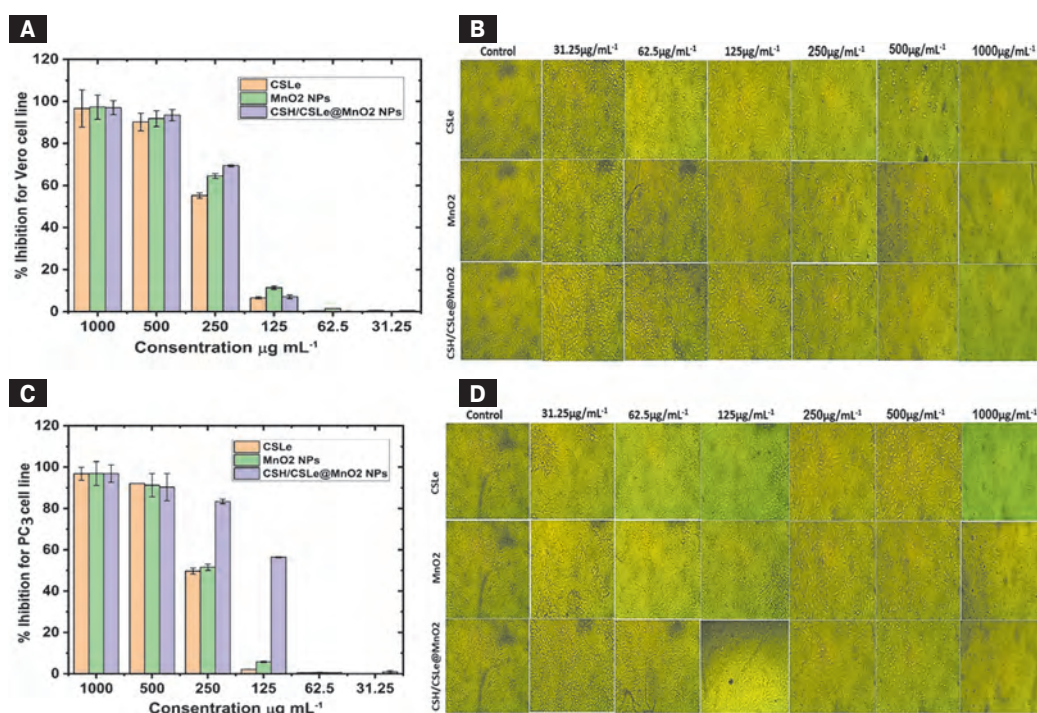


Figure 6. Cytotoxicity of SCLe, MnO_2 NPs, and CSH/SCLe@ MnO_2 NPs on normal Vero cells (A and B), and prostate carcinoma PC3 cells (C and D) for 24 h. The results were taken from replicated ($n = 3$) (Mean \pm SD). (B and D) Morphological features, the images were taken from the cells were treated with an average size of 10 nm for 24 h

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

