

3

МАЙ – ИЮНЬ

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

Том 100
2023

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

3

MAY – JUNE

VOLUME 100
2023

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

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

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

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

1.5.10. Вирусология (медицинские и биологические науки);

1.5.11. Микробиология (медицинские и биологические науки);

3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки);

3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские и биологические науки).

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

3

МАЙ – ИЮНЬ

**ТОМ 100
2023**

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

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)

ISSN 2686-7613 (Online)

DOI prefix: 10.36233

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

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

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

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

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

ПОДПИСКА:

ГК «Урал-пресс», индекс: 71436.
Тел.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

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

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

УЧРЕДИТЕЛИ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

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

**Начальник редакционно-
издательского отдела:**

Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

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

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов (<https://microbiol.crie.ru>).

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

Подписано в печать 28.06.2023.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 168 экз.
Усл.-печ. л. 15,5.

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

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2023

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместитель главного редактора

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

Ответственные секретари

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Кюрегян К.К., д.б.н., проф., заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Макарова М.А., д.м.н., старший научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Мескина Е.Р., д.м.н., зав. отделением детских инфекций отдела терапии, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия
Никонова А.А., к.б.н., зав. лаб. молекулярной биотехнологии ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

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

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

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

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

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

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

1.5.10. Virology (medical and biological sciences);

1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);

3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);

3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences).

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

3

MAY–JUNE

VOLUME 100

2023

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

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

DOI prefix: 10.36233

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

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

The CrossMark service is used.

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

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

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

Index for subscription to the printed version of the journal:

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

Full texts of issues of the journal are available:

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

FOUNDERS:

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

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://microbiol.crie.ru>) are rejected without further consideration.

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

Signed to the press on June 28, 2023.

Print format 60×90^{1/8}. Circulation 168 copies.

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

© Central Research Institute for Epidemiology, 2023

EDITOR-IN-CHIEF

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

Deputy Editor

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

Executive Secretaries

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

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Foreign members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Maria A. Makarova, Dr. Sci. (Medicine), senior researcher, Laboratory for Identification of Pathogens, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Карпова Т.И., Мелкумян А.Р., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Посуховский Е.А., Груздева О.А., Тартаковский И.С.**
Итоги многоцентрового мониторинга возбудителя инвазивного листериоза в мегаполисе* 143
- Еременко Е.И., Печковский Г.А., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н.**
Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий* 155
- Перетолчина Н.П., Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А., Климов В.Т., Трухачев А.Л., Джигоев Ю.П., Злобин В.И.**
Разнообразие CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их ассоциация с факторами патогенности возбудителя 166
- Иванов М.Ф., Балмасова И.П.**
Патогенетическая роль цитокинов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике и при различной степени тяжести 176
- Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю., Родионов И.С.**
Способность к вегетированию и спорообразованию штаммов *Bacillus anthracis* с различными фенотипическими свойствами в условиях, имитирующих почву 186
- Цвирукун О.В., Тихонова Н.Т., Тураева Н.В., Тишкова Ф.М., Рузиев М.М., Саидзода Ф.Б., Карпова Е.В., Иванова О.Е., Козловская Л.И.**
Состояние специфического иммунитета населения Республики Таджикистан к вирусам кори, краснухи, полиомиелита 194
- Игнатова Н.И., Заславская М.И., Александрова Н.А., Лапшина А.А., Махрова Т.В., Лукова О.А.**
Сравнительная оценка ферментативной и биоцидной активности *Candida auris* и *Candida albicans* 203

НАУКА И ПРАКТИКА

- Пица М.И., Михеева О.О., Соловьева Е.Д., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Черкашин Е.А., Петров В.В., Красовитов К.В., Черкашина А.С., Акимкин В.Г.**
Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации* 210
- Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Яковлева В.А., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф.**
Применение иммуномагнитной сепарации для ускоренного обнаружения клеток *F. tularensis* в образцах почвы с помощью иммунохроматографического теста 219

ОБЗОРЫ

- Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Дьяков И.Н., Зверев В.В., Файзулов Е.Б.**
Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения* 225
- Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д.**
Основные группы адъювантов и перспективы их использования для специфической профилактики особо опасных и других инфекционных болезней 237
- Повещенко А.Ф., Черкас В.Н., Кабаков А.В., Казаков О.В.**
Кишечная микробиота и канцерогенез: актуальные аспекты 247

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Aksenova E.I., Karpova T.I., Melkumyan A.R., Klimova E.A., Karetkina G.N., Posukhovskiy E.A., Grusdeva O.A., Tartakovskiy I.S.**
Outcomes of the multicenter monitoring of the causative agent of invasive listeriosis in the metropolis* 143
- Eremenko E.I., Pechkovskii G.A., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N.**
In silico analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages* 155
- Peretolchina N.P., Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumilchik E.A., Klimov V.T., Trukhachev A.L., Dzhioev Yu.P., Zlobin V.I.**
Diversity of CRISPR loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their association with pathogenicity factors 166
- Ivanov M.F., Balmasova I.P.**
Pathogenetic role of cytokines in hemorrhagic fever with renal syndrome in dynamics and disease of various severity 176
- Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Abramovich A.V., Shcherbakova V.Yu., Rodionov I.S.**
Ability for vegetation and spore formation of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypical properties under soil simulating conditions 186
- Tsvirkun O.V., Tikhonova N.T., Turaeva N.V., Tishkova F.Kh., Ruziev M.M., Saidzoda F.B., Karpova E.V., Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I.**
The state of specific herd immunity to certain vaccine-preventable infections in the Republic of Tajikistan 194
- Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., Lapshina A.A., Makhrova T.V., Lukova O.A.**
Comparative evaluation of enzyme and biocidal activity *Candida auris* and *Candida albicans* 203

SCIENCE AND PRACTICE

- Pika M.I., Mikheeva O.O., Solovyova E.D., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., Cherkashin E.A., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Cherkashina A.S., Akimkin V.G.**
Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification* 210
- Vetchinin S.S., Sheviakov A.G., Yakovleva A.V., Mironova R.I., Biketov S.F.**
Application of immunomagnetic separation for accelerated detection of *F. tularensis* cells in soil samples using an immunochromatographic test 219

REVIEWS

- Korchevaya E.R., Gracheva A.V., Dyakov I.N., Zverev V.V., Faizuloev E.B.**
Live attenuated COVID-19 vaccines: approaches to development and prospects for clinical use* 225
- Filippenko A.V., Trufanova A.A., Ivanova I.A., Omelchenko N.D.**
The main groups of adjuvants and the prospects of their use for the specific prevention of particularly dangerous and other infectious diseases 237
- Poveshchenko A.F., Cherkas V.N., Kabakov A.V., Kazakov O.V.**
Gut microbiota and carcinogenesis: actual aspects 247

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

ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-393>



Outcomes of the multicenter monitoring of the causative agent of invasive listeriosis in the metropolis

Olga L. Voronina^{1✉}, Natalia N. Ryzhova¹, Marina S. Kunda¹, Ekaterina I. Aksenova¹, Tatiana I. Karpova¹, Alina R. Melkumyan², Elena A. Klimova³, Galina N. Karetkina³, Evgeniy A. Posukhovskiy³, Olga A. Gruzdeva⁴, Igor S. Tartakovskiy¹

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

²F.I. Inosemtsev City Clinical Hospital, Moscow, Russia;

³A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

⁴Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Invasive listeriosis is a rare disease posing a threat to high-risk groups and often leading to a fatal outcome. Its causative agent is *Listeria monocytogenes*, a ubiquitous saprophyte that has turned into an important foodborne pathogen with the growing industry of semi-cooked and ready-to-eat products.

The aim of the study is the characterization of *L. monocytogenes* isolates in the Moscow region and identification of possible causes of susceptibility to infection

Materials and methods. The multicenter monitoring of *L. monocytogenes* was conducted in the Moscow metropolitan area, using bacteriological and genomic methods for description of the pathogen, medical history collection and detailed analysis of patient case summaries.

Results. In the cohorts of patients with perinatal listeriosis (PL) and meningitis-septicemia (MS), invasive listeriosis had a year-round occurrence with slight upswings in March–April and July–November. During the COVID-19 pandemic, in the MS group, the minimum age of patients decreased to 31 years and the proportion of deaths increased 1.57-fold compared to 2018–2019. During the pandemic, an increase in the diversity of *L. monocytogenes* genotypes was observed, along with changes in the spectrum of pathogen genotypes throughout the pandemic stages.

During the monitoring, a total of 73 *L. monocytogenes* clinical isolates belonging to 24 genotypes were described. Seven genotypes belonged to the first phylogenetic lineage (PLI); 14 genotypes belonged to PLII. The PL cohort had the highest proportion of PLI genotypes (52%). In the MS cohort, the group of men had the widest diversity of genotypes, 6 of which were identical to genotypes of food isolates. In the analysed set of isolates, 12 new profiles of internalin genes were identified and described. The whole genome sequencing detected the presence of plasmids in 9 of 58 genomes of clinical isolates. The comparison of core genomes revealed an epidemic relationship between isolates of the same genotype for ST4, ST21, and ST425.

Conclusion. The performed study presents a detailed description of the diversity and virulence of *L. monocytogenes* circulating in the Moscow metropolitan area, thus providing information for timely diagnosis and treatment of invasive listeriosis.

Keywords: *invasive listeriosis, Listeria monocytogenes, genotyping, core genome, food-borne infection, COVID-19*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 14, July 4, 2018).

Acknowledgement. We thank the Institut Pasteur for the curation and maintenance of BIGSdb-Pasteur databases at <https://bigsdb.pasteur.fr/>.

Funding source. The study was carried out with the financial support of the State Assignment of the N.F. Gamaleya.

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

For citation: Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Aksenova E.I., Karpova T.I., Melkumyan A.R., Klimova E.A., Karetkina G.N., Posukhovskiy E.A., Grusdeva O.A., Tartakovskiy I.S. Outcomes of the multicenter monitoring of the causative agent of invasive listeriosis in the metropolis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):143–154. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-393> EDN: <https://www.elibrary.ru/nzfzfb>

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-393>

Итоги многоцентрового мониторинга возбудителя инвазивного листериоза в мегаполисе

Воронина О.Л.¹, Рыжова Н.Н.¹, Кунда М.С.¹, Аксенова Е.И.¹, Карпова Т.И.¹, Мелкумян А.Р.², Климова Е.А.³, Кареткина Г.Н.³, Посуховский Е.А.³, Груздева О.А.⁴, Тартаковский И.С.¹

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

²Городская клиническая больница имени Ф.И. Иноземцева, Москва, Россия;

³Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия;

⁴Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Инвазивный листериоз — редкое заболевание, опасное для групп риска и часто приводящее к летальному исходу. Возбудитель — *Listeria monocytogenes* — убиквитарный сапрофит, ставший актуальным патогеном пищевого происхождения с развитием индустрии полуфабрикатов и продуктов быстрого приготовления.

Цель работы — характеристика изолятов *L. monocytogenes* в Московском регионе и определение возможных причин восприимчивости к инфекции.

Материалы и методы. Проведён многоцентровой мониторинг *L. monocytogenes* в Московском регионе с применением бактериологических и геномных методов в описании возбудителя, сбора анамнеза и подробного анализа эпикриза пациентов.

Результаты. В когортах перинатальный листериоз (ПЛ) и менингит-септицемия (МС) инвазивный листериоз встречался во все месяцы года с небольшими подъёмами в марте–апреле и июле–ноябре. В период пандемии COVID-19 в группе МС минимальный возраст пациентов снизился до 31 года, доля умерших выросла в 1,57 раза по сравнению с 2018–2019 гг. В период пандемии наблюдали рост разнообразия генотипов *L. monocytogenes* и изменения в спектре генотипов возбудителя на этапах пандемии.

За всё время мониторинга охарактеризовали 73 клинических изолята *L. monocytogenes*, относящихся к 24 генотипам. Семь генотипов принадлежали к первой филогенетической линии (PLI), 14 генотипов — к PLII. В когорте ПЛ была самая высокая доля генотипов PLI (52%). В когорте МС в группе мужчин отметили наибольшее разнообразие генотипов, 6 из которых совпадали с генотипами пищевых изолятов. В выборке изолятов описали 12 новых профилей генов интерналинов. Полногеномное секвенирование показало наличие плазмид в 9 из 58 геномов клинических изолятов. Сопоставление коровьих геномов выявило эпидемическую связь между изолятами одного генотипа в отношении ST4, ST21, ST425.

Заключение. Проведённое исследование предоставило подробное описание разнообразия и вирулентности *L. monocytogenes*, циркулирующих в Московском регионе, что будет способствовать своевременной диагностике и лечению инвазивного листериоза.

Ключевые слова: инвазивный листериоз, *Listeria monocytogenes*, генотипирование, коровий геном, пищевая инфекция, COVID-19

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 14 от 04.07.2018).

Благодарность. Мы благодарим Институт Пастера за курирование и обслуживание баз данных BIGSdb-Pasteur на <https://bigsdb.pasteur.fr/>.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания НИЦЭМ имени почетного академика Гамалеи Н.Ф.

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

Для цитирования: Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Карпова Т.И., Мелкумян А.Р., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Посуховский Е.А., Груздева О.А., Тартаковский И.С. Итоги многоцентрового мониторинга возбудителя инвазивного листериоза в мегаполисе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):143–154. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-393>
EDN: <https://www.elibrary.ru/nzfizb>

Introduction

Invasive listeriosis (IL) caused by a ubiquitous saprophyte *Listeria monocytogenes* is a rare disease associated with a high case fatality rate¹. Groups at risk for IL include pregnant women, embryos, fetuses, and newborns (the perinatal listeriosis (PL) cohort) as well as elderly people and immunocompromised individuals (the meningitis and/or septicemia (MS) cohort). According to statistics, in Moscow, 18 and 21 cases of listeriosis were reported in 2020 and 2021, respectively². However, considering the severity of the principal diagnosis in risk groups, we assume that cases of concomitant IL are underreported due to the absence of recorded results of laboratory tests. The multicenter study, which was approved for the Moscow metropolitan area at the end of 2018, was designed to analyze *L. monocytogenes* clinical isolates from hospitalized patients. In our project, we used the available data on the diversity of genotypes of *Listeria* clinical isolates in the European part of Russia; the data were obtained both during the retrospective study of isolates collected in 1971–1999 [1] and by the analysis of isolates from 2015–2017 [2]. Since the growing industry of semi-cooked and ready-to-eat products has turned *L. monocytogenes* into an important food-borne pathogen, the study also included isolates collected from food products at facilities supervised by the Moscow Department of Rospotrebnadzor. Although out of 6,883 food samples that were tested at laboratories in Moscow in 2020³, only a small percentage (0.6%) was tested positive for *Listeria*, the sources of *L. monocytogenes* demonstrate quite a wide variety: meat, poultry, fish, dairy products [3–6]. The environment as a source of *Listeria* should not be overlooked, as can be seen from the studies of nature parks and water bodies in the Central Federal District [7] as well as water bodies near livestock farms in the Vologda Region [8]. The COVID-19 pandemic gave rise to a new high-risk group — patients recovered from COVID-19; they are at high risk of development of listeriosis-associated sepsis and/or meningitis/meningoencephalitis and have high chances for an adverse outcome [9]. Microbiological studies conducted during the monitoring were designed to assess changes in the pathogen, employing molecular and genetic methods used by the

Centers for Disease Control and Prevention in the United States and Europe as well as by research centers in our country.

Materials and methods

During the monitoring period (from November 2018 to February 2023), we analyzed 73 *L. monocytogenes* clinical isolates obtained from 9 hospitals in Moscow and 44 food isolates provided by the Moscow Center for Hygiene and Epidemiology in the Central Administrative District of Moscow. The study group included hospitalized patients, whose samples were used to collect *Listeria* isolates for molecular and genetic studies.

The cultivation of *Listeria*, the analysis using molecular and genetic methods, including MLST (multi-locus sequence typing), MVLST (multi-virulence-locus sequence typing) and whole genome sequencing, genome assembly and annotation were performed as described previously [10].

The analysis of MLST alleles and allelic profiles (ST, sequence type) was performed using the resources of the Bacterial Isolate Genome Sequence Database for *L. monocytogenes* (BIGSdb-Lm⁴). The analyzed isolates and new allelic profiles were deposited in the website database, ID: 49370–49375; 75929–75933; 76308–76312; 76385–76389; 77384–78379; 78656–78660; 78713–78717; 82478–82494; 98277–98278; 98280–98297; 100872–100876; 102088–102092.

MvLST alleles were identified using the published sequences as reference sequences. The new *inlA*, *inlB*, *inlE* allelic variants were deposited in GenBank (Accession Numbers: MW538938, MW965279; MW538939, MZ486423; OM240824, OQ606809). For new internalin profiles, IPs (internalin gene (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlE*) profile), we used the previously established numbering system [11].

The sequenced genomes were deposited in GenBank under BioProject accession number PRJNA605697. The identified plasmids were registered under numbers MZ869810, MZ869811, OM867528–OM867530, OP752358–OP752360, OP921773, OP921774.

The core genome was analyzed following the MLST scheme for 1,748 loci [12] using an open-source bioinformatics software platform⁴. Virulence factors were identified using the virulence factor database⁵ and VF analyzer⁶ [13] as well as the BIGSdb-Lm database. The resistome was analyzed using the Antibiotic Resistance BIGSdb-Lm database and the data from the Comprehensive Antibiotic Resistance Database⁷ [14]. The

¹ WHO. Listeriosis. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis> (дата обращения 10.06.2023).

² Moscow Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Dynamics of infectious and parasitic morbidity in the population of Moscow in January-December 2021 compared to the same period last year. URL: <https://77.rospotrebnadzor.ru> (accessed on 10 May 2023)

³ Moscow Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Information on the activities of laboratories of the sanitary-hygienic, microbiological and parasitological profile of federal budgetary healthcare institutions - centers of hygiene and epidemiology for 2020. URL: <https://77.rospotrebnadzor.ru> (accessed on 10 May 2023)

⁴ Bacterial Isolate Genome Sequence Database for *L. monocytogenes*. URL: <https://bigfdb.pasteur.fr/listeria/>

⁵ Virulence Factors Database. URL: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>

⁶ URL: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFanalyzer/>

⁷ Comprehensive Antibiotic Resistance Database.

MobileElementFinder tool⁸ was used for detection of mobile genetic elements. The comparative analysis of sequences of RepA genes encoding the replication initiator protein was performed to identify the affiliation of plasmids to RepA phylogenetic groups [15]. CLC Genomics Workbench v. 21.0.1 and the Whole Genome Alignment plugin 21.0 were used for alignment of plasmids and construction of trees, using homologous plasmids from GenBank (CP015985, MZ089999, MZ147615, MZ065170, KU513859) for reference.

Results

Characterization of identified cases of invasive listeriosis

The monitoring of the IL pathogen in the Moscow metropolitan area lasted for more than 4 years. It covered the period before the COVID-19 pandemic and the time of the pandemic. Based on the main high-risk groups, the detected IL cases were distributed into two main cohorts: PL and MS. In the subset, throughout the monitoring period, PL cases accounted for 37%, showing a slight decrease during the pandemic: from 42% to 35%. The proportion of the MS cohort increased from 58% to 65% during the pandemic due to different factors, including an increase in IL cases among individuals of a younger age than the previously identified threshold of 59 years [3].

The minimum age of patients in this cohort decreased to 31 years (Fig. 1). The proportion of patients under 59 years of age was 34%. At the same time, the proportion of deaths in the study group increased 1.57-fold (from 36% before the pandemic to 57% during the COVID-19 pandemic).

Based on the number of IL cases accumulated throughout the monitoring period, the patients were distributed by months of the year, and the date of diagnosis was taken into consideration (Fig. 2). In both cohorts, IL occurred throughout the year, demonstrating slight upswings in March–April and July–November.

*Molecular and genetic analysis of *L. monocytogenes* isolates*

Diversity of genotypes during the monitoring period. 73 *L. monocytogenes* clinical isolates collected during the monitoring belonged to 24 genotypes. More virulent PLI included 7 genotypes (ST1, ST4, ST5, ST6, ST194, ST204, ST219); PLII included 14 genotypes (ST8, ST7, ST14, ST17, ST20, ST21, ST29, ST37, ST101, ST121, ST155, ST241, ST391, ST425, ST451, ST1365, ST2096).

The COVID-19 pandemic split the time of IL pathogen monitoring into two periods: 2018–2019 and 2020–2023. The latter, in its turn, can be divided into

three stages based on genetic characteristics of circulating SARS-CoV-2 variants:

- Stage I (March 2020 – May 2021) — circulation of various SARS-CoV-2 Pango lineages [16];
- Stage II (June 2021 – January 2022) — dominance of the delta variant [17];
- Stage III (February 2022 – present) — dominance of the omicron variant [18].

During the pandemic stages, we observed changes in the spectrum of genotypes of *L. monocytogenes* clinical isolates (Fig. 3). Autochthonous ST7 (PLII) and imported ST6 (PLI) that prevailed before the pandemic [3, 10] were detected very rarely during stage I. The detected ST4, ST219 (PLI) and ST391 (PLII) were genotypes new for Russia. *L. monocytogenes* ST21, ST37, and ST425 that were isolated during pandemic stage I had not been previously detected in human IL cases. Another 2 new genotypes of clinical isolates were detected during stage II: ST8 (PLII) and ST194 (PLI). During stage III, 4 *L. monocytogenes* genotypes, which had never been reported in Russia, were detected: ST17, ST29, ST204, and ST1365 — all representing PLII, and ST121 (PLII), which had not been previously detected in clinical isolates.

Diversity of genotypes in study groups. We compared the diversity of genotypes of *L. monocytogenes* isolates in the analyzed cohorts during the monitoring, having divided the MS cohort into 2 groups based on the gender of patients (MS_M — males; MS_F — females). As can be seen in Fig. 4, all groups had ST4, ST6, ST7 and ST8 isolates. The isolates from the MS_F group had 1 common genotype with isolates from PL (ST21) and MS_M (ST425) group, while the isolates from PL and MS_M groups had 3 common genotypes (ST1, ST194 and ST451). The isolates from the MS_M group had the largest number of genotypes (17); the Shannon index was 3.7. Isolates ST37 had the highest occurrence (21%) in the MS_M group, but they were not detected in other groups. The isolates of this genotype ranked second (20.5%) by the occurrence frequency in the group of food isolates (Fig. 5, a) and were found in all varieties of food products (Fig. 5, b).

Generally, the number of genotypes matching those in the group of food isolates was higher in the MS_M group: there were 6 matching genotypes (ST7, ST8, ST37, ST121, ST155, ST451), while PL and MS_F groups had only 2–3 genotypes matching genotypes of food isolates.

The food and clinical isolates with matching genotypes required close attention. First of all, their internalin profile (IP) was analyzed. Note that in food isolates of the most frequent genotypes (ST121, ST37, ST7), IPs were identical to profiles of clinical isolates. However, new profiles of IP genes were detected in isolates of other genotypes.

New IP profiles. 12 new profiles of IP genes (56, 58–62, 66–71) were reported in this study in 2020–2023

URL: <https://card.mcmaster.ca/>

⁸ URL: <https://cge.food.dtu.dk/services/>

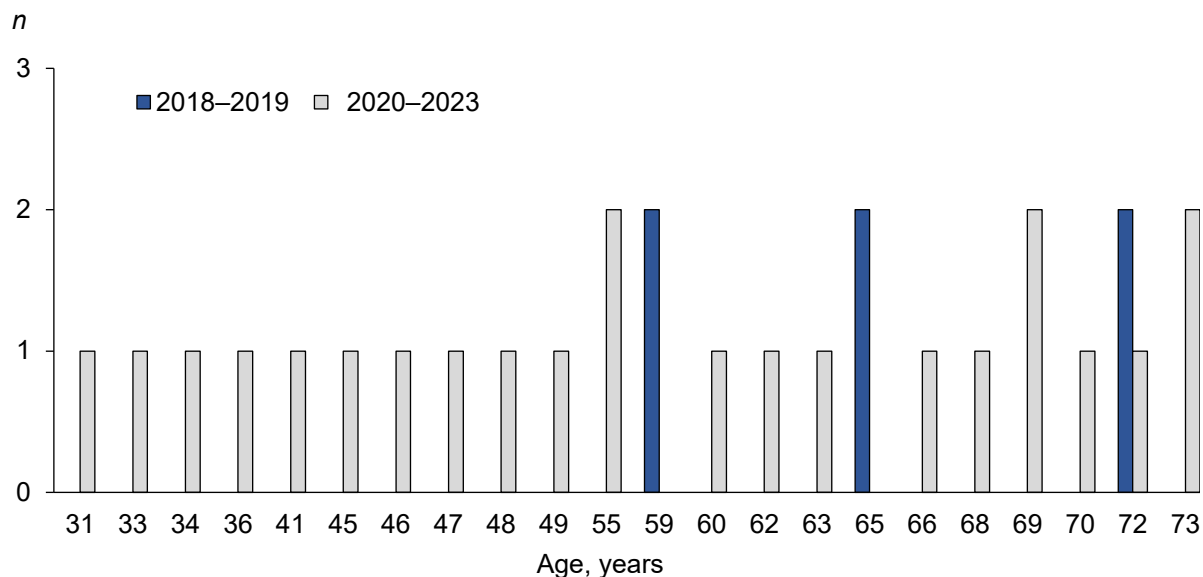


Fig. 1. Age of patients with IL before and during the COVID-19 pandemic in the MS cohort.

(Table). Only one new IP was detected in PLI isolate for ST219 that was new for Russia, the other were detected in PLII isolates belonging to new genotypes (26, 391, 1365, 204, 17, 29) and to the genotypes that had been previously detected in isolates from other sources. For example, the ST21 isolate obtained from a goat with listeriosis in the North Caucasian Federal District in 1975 (BIGSdb-Lm ID 41525) [1] had a different IP compared to ST21 clinical isolates obtained in 2020, demonstrating differences in the allele at the *inlC* locus. The ST425 clinical isolates also differed in IP from the isolate obtained in 2009 from the environment (from feces of deer *Cervus elaphus*, BIGSdb-Lm ID 5909 [19]): differences in *inlB* alleles. The ST155 isolates demonstrated various IPs. Before the COVID-19 pandemic, in the multicenter study, ST155 isolates were obtained twice: from food products (fish) and from a

patient. IPs of the isolates differed in alleles at the *inlE* locus. The isolate obtained from fish in 2021 matched the clinical isolate by IP; however, the isolate that was also obtained from fish in 2022 demonstrated new IP having differences at the *inlE* locus. Having compared the ST155 isolates from our subset with the isolates collected from rodents in the Far Eastern Federal District in 2006 [20], we found a difference at another locus — *inlB*. The ST451 and ST403 isolates had been previously obtained in Russia [2]; however, the types of their IPs were not identified; therefore, IPs of isolates of these genotypes were recorded for the first time.

Analysis of genomes of *L. monocytogenes* isolates

Comparison of core genomes (cgMLST). The comparison of core genomes (1,748 loci) gives the most complete understanding of the epidemic relationship of

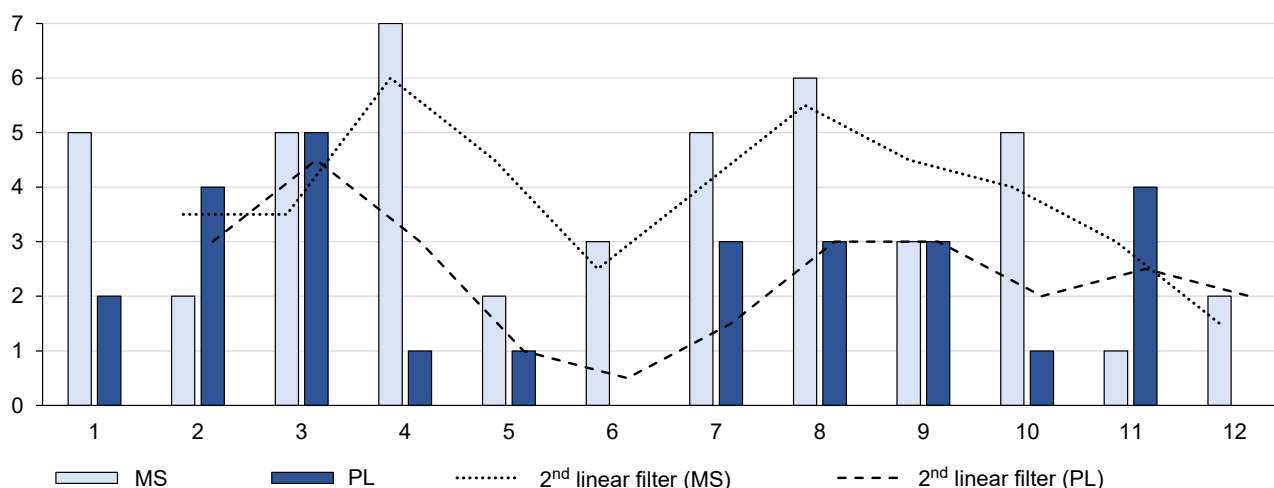


Fig. 2. Distribution of detected IL cases by months. MS — meningitis-septicemia; PL — perinatal listeriosis.

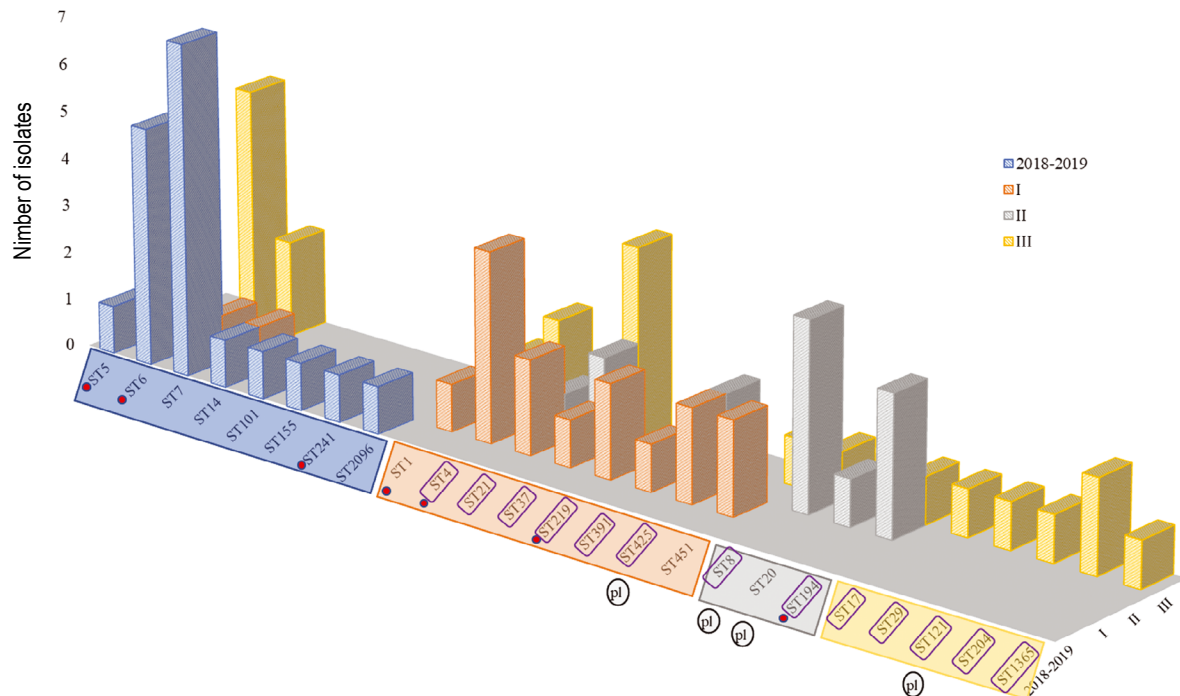


Fig. 3. Diversity of genotypes of *L. monocytogenes* clinical isolates before and during the COVID-19 pandemic

I–III — periods of the COVID-19 pandemic; isolates of phylogenetic lineage I are marked with red dots; new genotypes for *L. monocytogenes* clinical isolates are framed in purple. The presence of a plasmid in the genome is marked by pl shown in an oval.

isolates belonging to the same genotype. As can be seen in **Fig. 6**, ST4, ST425, and ST21 isolates obtained from different patients had 0–5 differences, thus providing a proof of an epidemic relationship of isolates belonging the same genotype. The core genomes of ST8, ST37 and ST451 isolates differed by 22–74 loci, demonstrat-

ing that *Listeria* of these genotypes are associated with multiple sources of infection.

Plasmids in L. monocytogenes genomes. Plasmids in *Listeria* genomes, especially in the genomes of clinical isolates, have rare occurrence [21]. Out of 72 *Listeria* spp. genomes sequenced in our projects

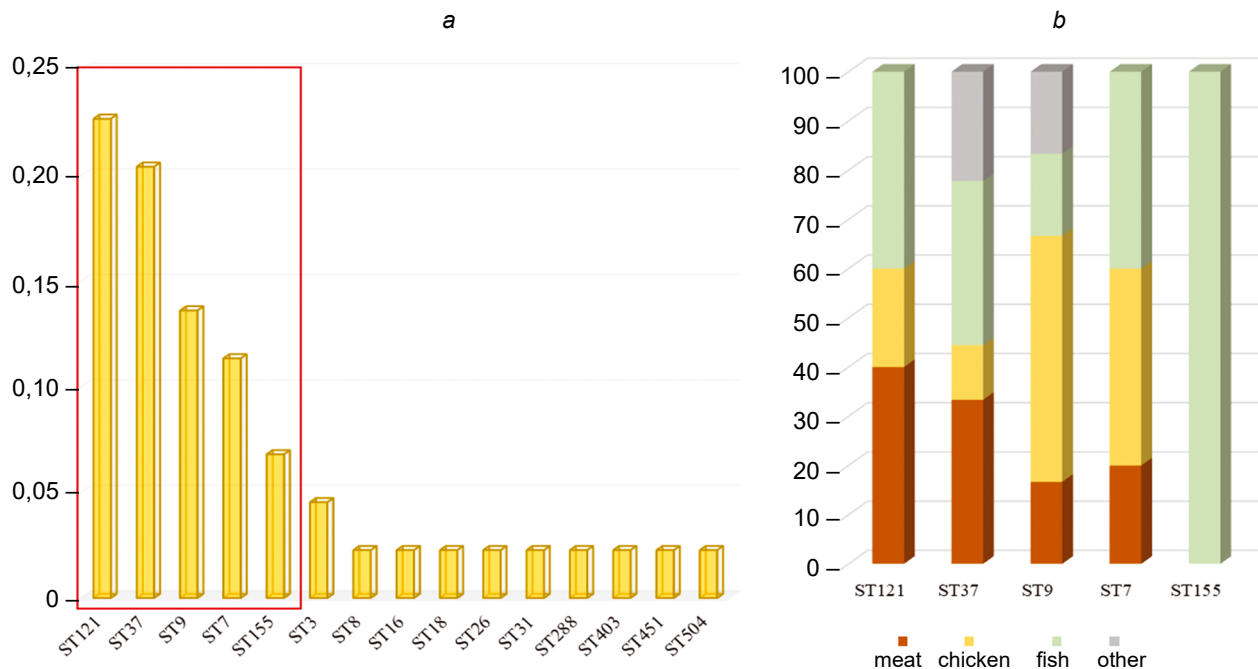


Fig. 5. *L. monocytogenes* isolates from food product.

a — the frequency of occurrence of different *L. monocytogenes* genotypes in products; b — distribution of the most represented *L. monocytogenes* genotypes by product categories. The red frame shows the most represented *L. monocytogenes* genotypes.

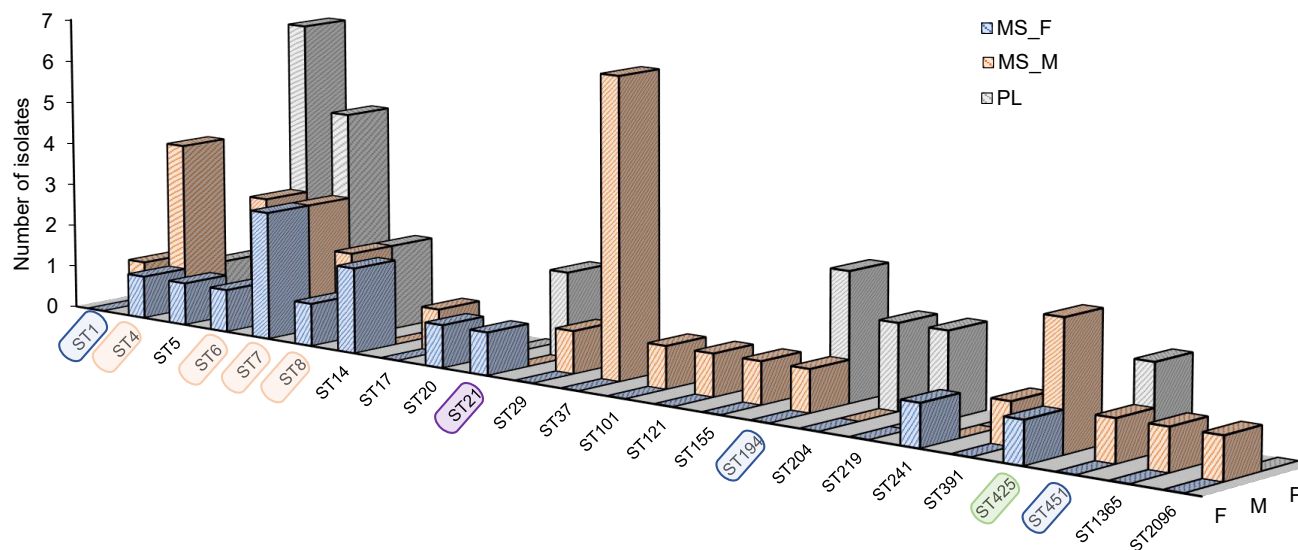


Fig. 4. Diversity of genotypes of *L. monocytogenes* clinical isolates in study groups.

MS_F — a group of women in the meningitis-septicemia cohort; MS_M — group of men in the meningitis-septicemia cohort; PL — perinatal listeriosis. The pink frame — genotypes common for all groups; the blue frame — genotypes common for MS_M and PL; the purple frame — genotypes common for MS_F and PL; the green frame — genotypes common for MS_M and MS_F.

(PRJNA658237, PRJNA326717, PRJNA326713, PRJNA605697), only 11 (15%) contained plasmids: 1 — in the genome of *L. welshimeri* isolate, ST2331, obtained at a meat processing factory [11]; 9 — in the genomes of *L. monocytogenes* clinical isolates, PLII (ST8, ST20, ST121, ST425); 1 — in the genome of the *L. monocytogenes* food isolate, ST121. The plasmids differed in size and replication group. The G1 RepA group included plasmids of *L. welshimeri* isolates of ST2331 (57530 bp) and *L. monocytogenes* isolates of ST20, ST425 (72763 bp); the G2 RepA group included plasmids of ST121 (62207 bp) and ST8 (86632 bp) isolates. Cadmium resistance genes were present in all plasmids. The plasmid of ST20 and ST425 isolates contained genes resistant to other heavy metals, oxidative stress, chan-

ges in pH and osmosis; the plasmid of ST121 contained genes of the type IV secretion system, which are responsible for conjugation transfer. The largest plasmid of ST8 isolates included all the above genes.

Analysis of virulence factors in genomes of isolates of the detected genotypes. Virulence factors (VFs) in *L. monocytogenes* genomes can be searched using the virulence factor database including 45 factors or the BIGSdb-Lm database with an extended list of 76 factors, including genes contained within pathogenicity islands LIPI-3 and LIPI-4. Most of the VFs presented by the databases were detected in 21 genotypes of sequenced genomes belonging to both phylogenetic lineages: PLI — 7 ST; PLII — 14 ST. With reference to the complete list of VFs, all representatives of PLII lacked

New Internalin Profile

Isolate	BIGSdb-Lm ID	CC	ST	inA	inB	inC	inE	IP	PL	Source
GIMC2056:LmcEH-1	49374	CC21	21	12	14	7	8	56	II	Clinical
GIMC2060:LmcH24-1	75931	CC11	451	22	23	6	6	58	II	Clinical
GIMC2062:Lmc5157	75933	CC26	26	7	14	6	6	59	II	Food
GIMC2073:LmcUH25	77384	CC4	219	23	8	4	3	60	I	Clinical
GIMC2077:LmcBH-1	78714	CC89	391	15	14	17	6	61	II	Clinical
GIMC2079:LmcUH26	78377	CC90	425	13	24	13	8	62	II	Clinical
GIMC2097:Lmc929	82487	CC403	403	9	23	21	17	66	II	Food
GIMC2117:Lmc22984	98289	CC155	155	10	14	19	18	67	II	Food
GIMC2120:LmcH51-1	98292	ST1365	1365	22	20	6	9	68	II	Clinical
GIMC2124:LmcUH35	98296	CC204	204	7	13	18	6	69	II	Clinical
GIMC2126:LmcH51-3	100872	CC8	17	12	14	6	17	70	II	Clinical, Food
GIMC2133:LmcZhH_1	102090	CC29	29	9	14	19	6	71	II	Clinical

Note. IP 57 (7; 13, 16, 6) was identified by S. Ermolaeva and E. Psareva (the data have not been published); IP 63–65 were published in [4]; CC — clonal complex; ST — sequence type; IP — internalin gene (*inA*, *inB*, *inC*, *inE*) profile; PL — phylogenetic lineage.

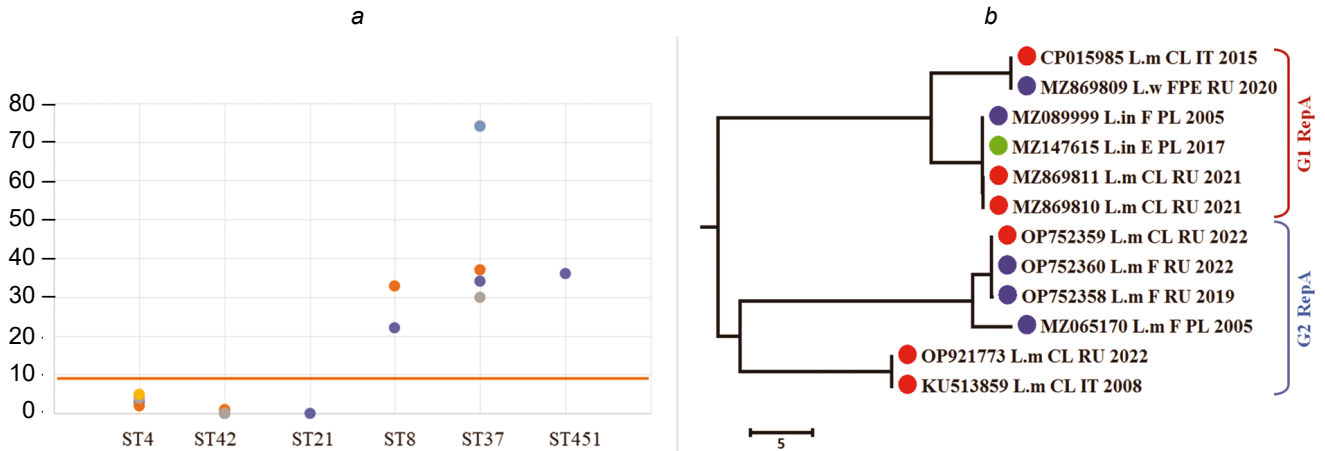


Fig. 6. Genomic characteristics of *L. monocytogenes* isolates.

a — the number of loci differentiating core genomes of the same genotype; *b* — plasmidome of the isolate subset.

The orange line indicates the permissible number of differences (7–10), based on which isolates can be assigned to the same epidemic outbreak. The *Listeria* species indicated on the phylogenetic tree: L.m — *L. monocytogenes*, L.w — *L. welshimeri*. Countries of origin of isolates: IT — Italy; PL — Poland; RU — Russia. Sources of isolates: F — food; E — environment; FPE — food production environment; CL — clinical isolates. Colored circles: red — clinical isolates; blue — food isolates; green — isolates from the environment.

the *aut_IVb* gene (LMOF2365_RS00075) encoding the invasion factor as well as the *LIP1-3* and *LIP1-4* genes. No *aut* (lmo1076, invasion), *tagB* (lmo1088, teichoic acid biosynthesis) and *inlL* (LMON_RS10535, internalin) genes were detected in *L. monocytogenes* genomes of PLI. Among the representatives of genotypes belonging to PLII, the *inlL* gene was detected only in genomes of 6 of 14 STs; *vip* (lmo0320, invasion) was also found in 6 of 14 ST; *inlG* (lmo0262, internalin) was detected in 11 of 14 STs. In genomes of PLI, the *inlG* gene was detected only in *L. monocytogenes* ST6. *LIP1-3* and *LIP1-4* were not represented in all genomes of PLI. *LIP1-3* (synthesis of listeriolysin S) was found in genomes of ST1, ST6, ST4, ST219 isolates, but in ST194, ST2, ST145 isolates, it was absent. *LIP1-4* (the sugar-transporting phosphotransferase system, PTS) was detected only in genomes of ST4, ST219 (CC4) isolates and ST194 (CC315) isolates.

Antibiotic resistance genes were grouped in a separate Antibiotic Resistance database by the developers of the BIGSdb-Lm database. The database includes 25 loci [12] represented by the chromosome genes and the genes that can be introduced by plasmids and transposons. All the analyzed genomes had 5 genes: *fosX* (lmo1702), *lin* (lmo0919), *mprF* (lmo1695), *sul* (lmo0224) and *norB* (lmo2818) providing resistance to fosfomycin, lincosamide, cationic peptides, sulfonamide and quinolones, according to the developers. The detected genes had genotype-specific alleles. The analysis of *sul* (lmo0224) gene sequences showed that they encoded dihydropteroate synthase that participated in the folate biosynthesis and served as the target for sulfonamide. Only amino acid substitutions at positions 58–71 (based on the *E. coli* numbering system), which form a connecting loop between β -strand 5 and α -helix E, help reduce the affinity to sulfonamide and provide

resistance [22]. These substitutions were not detected in the sequenced genomes. Therefore, it is more accurate to refer to lmo0224 as *folP* and, if there are no substitutions, classify it as a gene of the core genome.

In addition to the MFS transporter (*norB*), which is involved in the efflux of antibiotics, the resistance to quinolones can be induced by modifications of enzymes — targets for this class of antibacterial drugs. These enzymes include gyrase (GyrA, lmo0007) and topoisomerase (ParC, lmo1287). Mutations at positions 83 and 87 (the *E. coli* GyrA numbering system) in one of the two enzymes are most frequently associated with resistance [23]. In all the analyzed genomes, we detected Ser83 and Glu87 in the ParC sequence, which shows the consistency with characteristics of quinolone-resistant topoisomerases.

Additional resistance genes were detected only in one culture sample isolated from secretions of the cervical canal of a puerperal. The whole genome sequencing showed that the culture contained a small amount of admixture of ST41 *Enterococcus faecalis*. The *ermB* and *cat* genes responsible for resistance to macrolides, lincosamide, streptogramin B and fenicol were detected in the plasmid, while the *tetM*, *dfrD* genes responsible for resistance to tetracycline and trimethoprim were detected in the mobile element of the *E. faecalis* chromosome.

Discussion

The prolonged monitoring of IL cases in the Moscow metropolitan area expanded the collection of described *L. monocytogenes* clinical isolates obtained in the European part of Russia. A total of 73 isolates from 2018–2023 were added to 26 isolates from 1971–2017 in the BIGSdb-Lm database. The monitoring revealed the increased diversity of genotypes of *L. monocytogenes* clinical isolates both in the first and in the sec-

ond phylogenetic lineages. In the clinical isolates, the proportion of genotypes belonging to PLI increased from 15% in 1971–2017 to 37% in 2018–2023. The PL group demonstrated the most substantial increase in the proportion of genotypes of PLI (52% over the entire period) — from 38% in 2018–2019 to 58% in 2020–2023. The comparison with the data from the largest European collection of clinical isolates, which were obtained from the French National Reference Center for *Listeria* (2,584 PLI and PLII isolates collected in 2005–2013), shows that in the PL group, the proportion of PLI has almost reached the levels of France (PLI — 66%) [24]; for our subset of 2018–2023, this proportion is almost 2 times as low. The diversity of hypervirulent genotypes among the isolates obtained in the PL group — ST1, ST4, ST6, ST219, ST194 — is alarming. In their tests with animal models, Maury et al., who coined the term "hypervirulent", provided the evidence for a stronger association of CC4 (ST4, ST219) with perinatal infection and for the role of LIPI-4 (the sugar-transporting phosphotransferase system, PTS) in the ability of bacteria to cross the placental barrier [24]. LIPI-4 was also detected in the genomes of ST194 (CC315) isolates. While CC4 isolates had not been isolated from food products in Russia, the ST194 (CC315) isolates were detected by Psareva et al. in the collection of isolates obtained from dairy products in 2005 [4]. Out of isolates of PLII genotypes, strictly associated with food products in France (ST9, ST121) [24], the ST121 isolate was detected among the clinical isolates during the monitoring. In our list of PLII genotypes, 14 of 17 STs were identical to those listed by France in reference to intermediate isolates that are associated both with clinical manifestations and with food products. Among the recent large-scale studies, the study of isolates from cattle abortions (191 isolates collected in 2013–2018) in Latvia that borders Russia deserves special attention [25]. In that study, the proportion of PLI isolates was 2%. More than half of the isolates belonged to ST29, ST37, ST451 and ST7 [25], which we also detected during our monitoring. In total, 11 of 17 STs were the same both in the monitoring-based list of PLII genotypes and the list of genotypes from Latvia.

The decrease in the minimum age of patients with IL and the significantly increased proportion of deaths in the MS cohort during the COVID-19 pandemic are causing concern. Most of the patients of a younger age had laboratory-confirmed COVID-19 prior to IL. Assumedly, it was COVID-19-associated hospitalization

that contributed to the development of the epidemic relationship among *L. monocytogenes* isolates of the same genotype representing ST4, ST425, ST21. For example, during the COVID-19 pandemic (in September–October 2020), Italy reported an outbreak of hospital-acquired listeriosis caused by *L. monocytogenes* ST451. The contamination was found in the meat on the hospital kitchen. A total of 4 patients (1 immunocompromised, 3 with cancer) were infected [26]. In Germany, 13 of 39 listeriosis cases caused by *L. monocytogenes* ST8 were detected at health-care facilities where patients had ready-to-eat meat products from the same manufacturer. The core genomes of isolates had differences in 0–10 loci, thus being indicative of the epidemic relationship [27].

The analysis of antibiotic resistance genes showed that all sequenced genomes had genotype-specific alleles *fosX* (lmo1702), *lin* (lmo0919), *mprF* (lmo1695), *norB* (lmo2818), *parC* (lmo1287), which were responsible for resistance to fosfomycin, lincosamide, cationic peptides and quinolones. The fact that additional resistance genes (*ermB*, *cat*, *tetM*, *dfpD*) were detected in the culture with *E. faecalis* admixture highlights the importance of inspection of the culture for purity before the test, especially when the isolation involves such biotope as the cervical canal, in which *E. faecalis* is within the normal range in 18% of pregnant women and is detected 2 times as often during inflammatory processes [28].

Additional genes associated with resistance to disinfectants and environmental stress factors were detected in genomes of plasmid-containing isolates: ST8, ST20, ST121, ST425. When such isolates are detected, disinfection of hospital and industrial premises requires new combinations of disinfectants.

Conclusion

The multicenter monitoring of IL in the Moscow metropolitan area revealed that not only *L. monocytogenes* hypervirulent genotypes belonging to the first phylogenetic lineage (PLI), but also and primarily hypovirulent genotypes of PLII are responsible for the infection in patients of high-risk groups. The new high-risk group including patients recovered from COVID-19, the risk of hospital-acquired infection, the increased diversity of *L. monocytogenes* genotypes, the emergence of strains with plasmids carrying genes resistant to disinfectants and environmental stress factors — these are new realities that should be given attention in IL diagnosis and treatment.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A., et al. Retrospective study of *Listeria monocytogenes* isolated in the territory of inner Eurasia from 1947 to 1999. *Pathogens*. 2019;8(4):184. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8040184>
- Асташкин Е.И., Алексеева Е.А., Борзенков В.Н. и др. Молекулярно-генетическая характеристика полирезистентных штаммов *Listeria monocytogenes* и идентификация новых сиквенс-типов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(4):3–13. DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen2021390413> EDN: <https://www.elibrary.ru/eixxrf>
Astashkin E.I., Alekseeva E.A., Borzenkov V.N., et al. Molecular-genetic characteristics of polyresistant *Listeria monocytogenes* strains and identification of new sequence types. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2021; 36(4): 159–69. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416821040029> EDN: <https://www.elibrary.ru/xverak>
- Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и др. Листерииоз: генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(4):261–73. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., et al. Listeriosis: genotyping as a key for identification a possible source of infection. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(4):261–73. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmacc.2019.4.261-273> EDN: <https://www.elibrary.ru/chgmuc>
- Psareva E.K., Liskova E.A., Razheva I.V., et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food products in the Central European part of Russia in 2000–2005 and 2019–2020. *Foods*. 2021;10(11):2790. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10112790>
- Yushina Yu.K., Kuznetsova O.A., Tutelyan A.V., et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products during 2017–2019 depending on technological factors and seasons. *Theory and Practice of Meat Processing*. 2022; 7(4): 238–46. DOI: <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-4-238-246>
- Белова Л.В., Репникова Н.Е., Сухова Е.А. Результаты микробиологических исследований рыбы и рыбопродуктов и требования по профилактике заболеваний листериозом. *Проблемы медицинской микологии*. 2022;24(2):35–7. Belova L.V., Repnikova N.E., Sukhova E.A. Results of microbiological studies of fish and fish products and requirements for the prevention of listeriosis diseases. *Problems in Medical Mycology*. 2022;24(2):35–7. DOI: <https://doi.org/10.24412/1999-6780-2022-2-34-37> EDN: <https://www.elibrary.ru/ctfvvk>
- Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., et al. Diversity and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental sources in the Russian Federation. *IJMER*. 2015;5(3):5–15.
- Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Фурсова Н.К. и др. Первый случай выявления *Listeria monocytogenes* сиквенс-типов ST7, ST20, ST425 в сточных водах при обследовании водных объектов Вологодской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):453–64. Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Fursova N.K., et al. The first case of detection of *Listeria monocytogenes* sequence types ST7, ST20, ST425 in wastewater during an investigation of water bodies in the Vologda region. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(4):453–64. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-266> EDN: <https://www.elibrary.ru/gashhr>
- Климова Е.А., Воронина О.Л., Кареткина Г.Н. и др. Листерииоз и пандемия COVID-19. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2022;11(1):102–12. Klimova E.A., Voronina O.L., Karetkina G.N., et al. Listeriosis and the COVID-19 pandemic. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2022;11(1):102–12. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2022-11-1-102-112> EDN: <https://www.elibrary.ru/cgtxxv>
- Воронина О.Л., Тартаковский И.С., Ющук Н.Д. и др. Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(6):547–55. Voronina O.L., Tartakovskii I.S., Yushchuk N.D., et al. Analysis of sporadic cases of invasive listeriosis in a metropolis. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(6):547–55. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-3> EDN: <https://www.elibrary.ru/dziqzj>
- Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Аксёнова Е.И. и др. Генетическое разнообразие листерий, выявленных в производственной среде переработки мяса. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2023;41(1):24–31. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., et al. Genetic diversity of listeria found in the meat processing environment. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2023;41(1):24–31. DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen20234101124> EDN: <https://www.elibrary.ru/wtlkqz>
- Moura A., Criscuolo A., Pouseele H., et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol*. 2016;2:16185. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
- Chen L., Yang J., Yu J., et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Issue suppl. 1):D325–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
- Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D690–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Chmielowska C., Korsak D., Chapkauskaitse E., et al. Plasmidome of *Listeria* spp. — the repA-family business. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(19):10320. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms221910320>
- Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., et al. Neutralizing activity of sera from Sputnik V-vaccinated people against variants of concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow endemic SARS-CoV-2 variants. *Vaccines*. 2021;9(7):779. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9070779>
- Klink G.V., Safina K.R., Nabieva E., et al. The rise and spread of the SARS-CoV-2 AY.122 lineage in Russia. *Virus Evol*. 2022;8(1):veac017. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/veac017>
- Gangavarapu K., Latif A.A., Mullen J.L., et al. Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. *Nat. Methods*. 2023;20(4):512–22. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01769-3>
- Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и др. Закономерности селекции полигостальных убиквитарных микроорганизмов на примере представителей трех таксонов. *Молекулярная биология*. 2015;49(3):430–41. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0026898415030179> EDN: <https://www.elibrary.ru/tqqvfh>
Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., et al. Regularities of the ubiquitous polyhostal microorganisms selection by the example of three taxa. *Molecular Biology*. 2015;49(3):380–90. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893315030176> EDN: <https://www.elibrary.ru/ueytrz>
- Adgamov R., Zaytseva E., Thiberge J.M., et al. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals. In: Caliskan M., ed. *Genetic Diversity in Microorganisms. Chapter 9*. IntechOpen; 2012. DOI: <https://doi.org/10.5772/32913>

21. Lebrun M., Loulergue J., Chaslus-Dancla E., Audurier A. Plasmids in *Listeria monocytogenes* in relation to cadmium resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992;58(9):3183–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.3183-3186.1992>
22. Vedantam G., Guay G.G., Austria N.E., et al. Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(1):88–93. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.88>
23. Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014;53(10):1565–74. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
24. Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* 2016;48(3):308–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3501>
25. Šteingolde Ž., Meistere I., Avsejenko J., et al. Characterization and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from cattle abortions in Latvia, 2013–2018. *Vet. Sci.* 2021;8(9):195. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci8090195>
26. Russini V., Spaziante M., Zottola T., et al. A nosocomial outbreak of invasive listeriosis in an Italian hospital: epidemiological and genomic features. *Pathogens.* 2021;10(5):591. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050591>
27. Lachmann R., Halbedel S., Adler M., et al. Nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with consumption of meat products in health care facilities, Germany, 2014–2019. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021;27(7):1035.e1–e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.020>
28. Каганова М.А., Спиридонова Н.В., Казакова А.В. и др. Особенности микробиоты цервикального канала при дородовом излитии околоплодных вод и доношенной беременности. *Акушерство и гинекология.* 2019;(5):77–84. Kaganova M.A., Spiridonova N.V., Kazakova A.V., et al. Features of the cervical canal microbiota in prenatal amniorrhea and full-term pregnancy. *Obstetrics and Gynecology.* 2019;(5):77–84. DOI: <https://doi.org/10.18565/aig.2019.5.77-84> EDN: <https://www.elibrary.ru/hscrpw>

Информация об авторах

Воронина Ольга Львовна — к.б.н., доцент, зав. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olv550@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

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

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

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

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

Мелкумян Алина Рантиковна — к.м.н., зав. центром лабораторной диагностики ГКБ им. Ф.И. Иноземцева, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5494-415X>

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

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

Посуховский Евгений Андреевич — врач-ординатор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7763-0313>

Груздева Ольга Александровна — д.м.н., профессор каф. эпидемиологии РМАНПО, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1244-1925>

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

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

Статья поступила в редакцию 14.04.2023;
принята к публикации 14.06.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Olga L. Voronina — Cand. Sci. (Biol.), Assistant Professor, Head, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, olv550@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

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

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

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

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

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

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

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

Evgeniy A. Posukhovskiy — resident doctor, Department of infectious diseases and epidemiology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7763-0313>

Olga A. Gruzdeva — D. Sci. (Med.), Professor, Department of epidemiology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1244-1925>

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

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

The article was submitted 14.04.2023;
accepted for publication 14.06.2023;
published 28.06.2023



***In silico* analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages**

Evgeny I. Eremenko[✉], Grigorii A. Pechkovskii, Alla G. Ryazanova, Sergey V. Pisarenko, Dmitry A. Kovalev, Lyudmila Yu. Aksenova, Ol'ga V. Semenova, Alexander N. Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. The global phylogenetic population structure of *Bacillus anthracis* is represented by major genetic lineages (A, B and C) with nonuniform distribution of isolates, which still cannot be explained. Identification of characteristics of genomes of strains from three lineages, which can affect their spread, is of high importance. The **aim** of the study is to explore genomic characteristics of different genetic lineages, which may have an effect on their distribution, by using the *in silico* analysis of a representative subset of *B. anthracis* strains.

Materials and methods. The whole-genome sequences of 49 *B. anthracis* strains and *Bacillus cereus biovar anthracis* CI strain were studied. The *in silico* analysis was performed to identify polymorphisms using BLASTn, MEGA X, Tandem Repeat Finder, Parsnp the Harvest Suite software.

Results. The genome variability depended on single nucleotide polymorphisms, single-nucleotide repeats, number of tandem repeats, substitutions and indels. In strains from lineages B and C, they outnumbered 1.6–13.4 times and in the *B. cereus biovar anthracis* strain — 5–150 times those in *B. anthracis* strains from lineage A. Significant substitutions in housekeeping genes and pathogenicity factor genes caused changes in amino acid sequences in proteins significantly more frequently in *B. anthracis* strains from major lineages B and C.

Based on the molecular typing and a multi-virulence-locus sequence typing analysis (MVLST) with a discrimination index of 0.9633, strains were classified into three major genetic lineages including groups different from the canonical group.

Conclusion. The distinctive feature of *B. anthracis* genomes is that they have a larger number of significant nucleotide substitutions in pathogenicity factor genes and housekeeping genes of strains belonging to major lineages B and C compared to lineage A. Changes in proteins encoded by them can cause differences in ecological adaptation and in prevalence, which are higher in strains of lineage A. MVLST having a high discriminating capacity can be used as an additional method to *B. anthracis* molecular typing.

Keywords: *Bacillus anthracis*, genetic lineages, pathogenicity factors, molecular typing

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

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

For citation: Eremenko E.I., Pechkovskii G.A., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. *In silico* analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(3):155–165.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-385>

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

Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий

Еременко Е.И.[✉], Печковский Г.А., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н.

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. Филогенетическая структура глобальной популяции *Bacillus anthracis* представлена главными генетическими линиями А, В и С с неравной распространённостью изолятов, причина которой неизвестна. Определение особенностей геномов штаммов трех линий, которые могут влиять на распространённость, является актуальным.

Цель — характеристика особенностей геномов разных генетических линий, потенциально влияющих на их распространённость, с использованием анализа *in silico* представительной выборки штаммов *B. anthracis*

Материалы и методы. Изучены полногеномные последовательности 49 штаммов *B. anthracis* и штамма CI *B. cereus biovar anthracis*. Анализ *in silico* проводили с идентификацией полиморфизмов в программах «BLASTn», «MEGA X», «Tandem Repeat Finder», «Parsnp» из пакета «Harvest Suite».

Результаты. Вариабельность геномов определялась однонуклеотидными полиморфизмами, однонуклеотидными повторами, числом тандемных повторов, заменами и инделями. Их количество у штаммов линий В и С было в 1,6–13,4 раза больше, а у штамма *B. cereus biovar anthracis* — в 5–150 раз больше, чем у штаммов *B. anthracis* линии А. Значимые замены в генах домашнего хозяйства и факторов патогенности приводили к изменению аминокислотной последовательности белков также значительно чаще у штаммов *B. anthracis* главных линий В, С.

Молекулярное типирование на основе анализа однонуклеотидных полиморфизмов генов факторов патогенности (MVLST) с индексом дискриминации 0,9633 разделяло штаммы на три главные генетические линии с группами, отличающимися от канонических.

Заключение. Главное отличие геномов *B. anthracis* состоит в большом количестве значимых нуклеотидных замен в генах факторов патогенности и «домашнего хозяйства» штаммов главных линий В и С по сравнению с линией А. Изменения в кодируемых ими белках могут определять разную экологическую адаптацию и распространённость, более высокие у линии А. MVLST с высокой дискриминирующей способностью может быть дополнительным методом молекулярного типирования *B. anthracis*.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, генетические линии, факторы патогенности, молекулярное типирование

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

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

Для цитирования: Еременко Е.И., Печковский Г.А., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):155–165.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-385>

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

Introduction

The global population of *Bacillus anthracis* is represented by three major genetic lineages (A, B, and C) including 14 canonical (canSNP) groups. Pathogen strains are distributed among them nonuniformly; representatives of lineage A prevail (about 90%), lineage B accounts for approximately 10%, while lineage C includes only 3 strains (less than 1%) [1, 2]. The distinct clade in the *Bacillus cereus sensu lato* group including *B. anthracis* is represented by *Bacillus cereus biovar anthracis* strains that can cause anthrax-like infection [3, 4]. The factors causing the nonuniform distribution of *B. anthracis* strains in different genetic lineages are still unknown. The question why strains of lineage A have become widely dispersed throughout the world, while strains of lineage B are limited in number and do not have a wide global distribution remains unanswered.

This nonuniformity can be explained by adaptive genetic differences, which have an impact on survival and reproduction in the environment or in the host body.

The reproduction efficiency in the host body depends on adaptive genetic differences of pathogenici-

ty factors. The pathogenicity of *B. anthracis* depends on the main factors: Two binary exotoxins, lethal and edema factors, and the poly- γ -glutamic acid capsule [2]. Exotoxin components, lethal and edema factors, and the protective antigen (PA) are encoded by *lef*, *cya* and *pagA* genes located on the pXO1 plasmid [5]. The capBCDAE operon for capsule production is encoded by the pXO2 plasmid [2]. The loss of either of the two plasmids results in avirulence of strains. At the same time, strains carrying both plasmids significantly differ by their virulence as demonstrated by laboratory animals. The Carbosap vaccine strain attenuation not associated with the loss of pXO1 and pXO2 plasmids results from chromosomal deletions containing more than 50 genes, which have a known or proposed function that could be linked to virulence [6]. The detected differences in the virulence of strains producing a specific toxin and a typical capsule suggest the existence of additional pathogenicity factors. The role of such factors is claimed by many products of the anthrax microbe:

- the GerXC protein encoded by the *gerXC* plasmid gene and required for spore germination *in vivo* [7];

- phospholipase C (*PIC* gene) [8];
- nitric oxide synthase (*nos* gene) [9];
- bifunctional lysyl-phosphatidylglycerol flippase/synthase (*mprF* gene) [10];
- metalloprotease of the enhancin family (*GBAA_RS16775* locus), homolog of which was first described in baculoviruses [11, 12];
- immune inhibitor A metalloprotease (*inhA* gene) [12];
- quorum-sensing signal molecule autoinducer LuxS (*luxS* gene) [13];
- anthrolysin O (ALO) (cholesterol-dependent cytolysin) (*alo* gene) [14];
- enterotoxin FM (EntFM) (*entFM* gene) [13].

Some *B. anthracis* strains have a set of phenotypic characteristics, which distinguish them from typical virulent strains; among them, the inability to grow in a minimal synthetic medium without tryptophan, and reduced virulence in rabbits. The genetic factors underlying these changes have not been identified [16].

There are publications reporting the effect of amino acid substitutions in the lethal factor protein on its catalytic activity and binding to PA [17–19]. The data were obtained during tests where mutations were introduced into the described genes to assess their impact on the virulence of mutant strains compared to wild-type strains. Allelic polymorphism for the PA gene that is represented by 6 allelic types in natural wild-type strains [20] was also described for other genes of pathogenicity factors [21–23]. However, the variability of chromosomal genes encoding products, for which the impact on the virulence of *B. anthracis* has been identified or assumed, remains unexplored. Quantitative and qualitative distinctive characteristics of polymorphisms inherent in genomes of strains belonging to certain genetic lineages have not been identified.

The molecular typing of *B. anthracis* using multi-virulence-locus sequence typing (MVLST) did not include chromosomal genes.

The urgent need for this study was dictated by the absence of the data that would shed a new light on the pathogenesis of anthrax infection, help identify potential targets for development of new products for treatment and prevention of this infection, contribute to the knowledge of the evolution of the anthrax-causing pathogen and methods of its molecular typing.

The **aim** of the study was to explore characteristics of genomes of different genetic lineages, which have a potential impact on the distribution of strains, by using the *in silico* analysis of a representative subset of *B. anthracis* strains.

Materials and methods

The study was performed using complete genomes of 49 diplasmid strains, including 19 *B. anthracis* isolates from the collection of pathogenic microorganisms from the Stavropol Research Anti-Plague Institute of

Rospotrebnadzor and 30 isolates from the GenBank database, which belong to major genetic lineages A, B, C and 14 canSNP groups, as well as the genome of *Bacillus cereus biovar anthracis* strain CI.

GenBank¹ identifiers for genomes: GCF_000008445.1, GCF_009831565.1, GCF_000167335.1, GCF_003063965.1, GCF_003064045.1, GCF_003860145.1, GCF_000793525.1, GCF_000832965.1, GCF_000310045.1, GCF_000167235.1, GCF_000534935.2, GCF_000258885.1, GCF_000278385.1, GCF_000832465.1, GCF_001273005.1, GCF_001273085.1, GCF_000167295.1, GCF_002896575.1, GCF_014249775.1, GCF_003227955.1, GCF_000831505.1, GCF_000832745.1, GCF_003064005.1, GCF_000008165.1, GCF_000583105.1, GCF_000833275.1, GCF_022221345.1, GCF_000743805.1, GCF_900014355.1, GCF_002356575.1, GCF_000143605.1.

The *in silico* analysis was performed using the genome of the *B. anthracis* Ames Ancestor strain (GenBank: NC_007530.2; NC_007322.2; NC_007323.3) as a reference genome. Polymorphisms were identified using BLAST, BLASTp, MEGA X, MAUVE, Tandem Repeat Finder programs. The alignment of pooled sequences of pathogenicity factor genes and the translation of nucleotide sequences of genes were performed using the MEGA X program. The whole-genome analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed using the Parsnp program from the Harvest Suite for multiple alignment of genomic sequences. The input data included genomes of 50 strains described above; they were aligned with the chromosomal nucleotide sequence of the reference genome of *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: NC_007530.2) using Parsnp (parameters `c -e -u -C 1000`). The detected SNPs were extracted into a VCF file using HarvestTools v. 1.0. The edited file was used as an input file in HarvestTools to compile a FASTA file.

The phylogenetic tree was reconstructed by the neighbor-joining method in MEGA X in accordance with Tamura-Nei model; the bootstrapped confidence interval was based on 1,000 replicates; the goeBURST Full MST method and PHYLOViZ 2.0 program were used for identification of clonal complexes. The Fig-Tree program was used for dendrogram visualization. The Hanter–Gaston discriminatory index was calculated in accordance with [24].

Results

Analysis of polymorphisms of the chromosomal region of the B. anthracis and Bacillus cereus biovar anthracis

¹ URL: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/833/275/>

genome

The variability of the chromosomal region in *B. anthracis* and *B. cereus biovar anthracis* depended on SNPs, single-nucleotide repeats (SNR), tandem repeats, substitutions and indels (insertions/deletions). The main polymorphisms in chromosomal genomes were represented by SNPs (**Table 1**). Strains belonging to different genetic lineages had noticeable differences in the number of polymorphisms.

Chromosomal marker (specific) SNPs were identified for *B. anthracis* major genetic lineages (**Table 2**).

Strains of lineages B and C demonstrated significant differences in the relative amounts of marker SNPs compared to lineage A.

Most of the marker SNPs from lineages A and B were primarily located in housekeeping genes, out of which 4 genes were associated with sporulation and spore germination.

Analysis of SNPs of pathogenicity factor genes

The analysis included 19 variable genes encoding products associated with pathogenicity (**Table 3**).

The gene variability depended on the presence of SNPs, VNTRs and INDELS. The largest number of all SNPs and nonsynonymous SNPs per one genome was found in the *B. cereus biovar anthracis* strain followed by *B. anthracis* strains of lineage C, lineage B, lineage A. The deletion in the *trpA* gene resulted in the formation of pseudogenes and the absence of functional proteins in some strains of lineage B. In the *B. cereus biovar anthracis* strain, the frameshift mutation caused the formation of the pseudogene and absence of the MobI relaxase (capsule-production plasmid pIC-XO2). There are noticeable differences in the number of SNPs in different genes and in strains of different genetic lineages.

Analysis of the polymorphism of pathogenicity factor proteins in strains of different genetic lineages

The lethal factor. In the lethal factor protein, substitutions *E709G* and *E681K* are located within domain 4, which contains the catalytic center, at the distance of 10 and 37 amino acids, respectively, from the zinc binding site; substitutions *A299T*, *L298M* and *R543Q* are located in domain 2, substitutions *E66K* and *V246I* — in domain 1.

The edema factor. All strains of lineage B had substitutions *D180G* and *318T*. The strain of lineage C and *B. cereus biovar anthracis* strain CI have substitutions *K278E*, *I318T* and *N789K*. The *B. cereus var. anthracis* strain CI has substitution *V694A*. Substitutions *D180G* and *K278E* are located within the PAB domain, *I318T* — in the CA segment of the ACD core domain, *V694A* and *N789K* — in the helical region of the edema factor.

The protective antigen. Strains of lineage A were found to have substitutions *A600V* and *P565S*; strains of lineage B had substitutions *I433V* and *A600V*; the strain of lineage C and *B. cereus biovar anthracis* strain CI had substitutions *S66P* and *A600V*. *B. cereus biovar anthracis* strain CI had substitution *S290I*. Substitution *S66P* was located in domain 1, substitution *I433V* — in domain 2, substitution *P565S* — in domain 3; substitution *A600V* — in domain 4 in the receptor-binding region (L595–T735).

The comparative analysis was performed using PA genes and proteins in all live spore vaccines based on strains Carbosap, 34F2_Sterne, A16R, Tsiankovskii-1, STI-1, 55VNIIViM, 228/8 and Brazilian vaccinal as well as in chemical vaccines based on PA of the avirulent V770-NP-1R strain (U.S. vaccines AVA (or Bio-Thrax) and AV7909) and based on PA of vaccine strain 34F2_Sterne (vaccine AVP; United Kingdom). All

Table 1. Polymorphisms of chromosome genomes of *B. anthracis* and *B. cereus biovar anthracis* strains

Major lineage	Strain	Quantity of polymorphisms comparing with <i>B. anthracis</i> strain Ames Ancestor					
		SNP	SNR	tandem repeats	substitutions	indels	total
A	Australia 94	411	142	23	8	64	648
A	Vollum	609	233	32	12	68	954
B	SVA11	1693	418	73	16	109	2309
C	2002013094	2381	576	99	134	414	3604
<i>B. cereus biovar anthracis</i>	CI	76 714	1075	188	7857	1783	87 617

Table 2. Marker SNPs for chromosome genomes of *B. anthracis*

Major lineage	Quantity of marker SNP	Ratio marker SNPs/genome	SNP localization	
			gene	intergene space
A	180	4,73	152	28
B	183	18,3	141	42
C	594	594	Not tested	Not tested

Table 3. SNPs in pathogenicity factors genes of *B. anthracis* strains of different lineages

Gene	Ratio quantity of SNPs/genome in strains of lineages							
	A (n = 38)		B (n = 10)		C (n = 1)		<i>B. cereus biovar anthracis</i> (n = 1)	
	total	nonsynonimic	total	nonsynonimic	total	nonsynonimic	total	nonsynonimic
<i>cya</i>	7/0,18	4/0,1	3/0,3	2/0,2	6	4	6	4
<i>lef</i>	2/0,05	2/0,05	2/0,2	2/0,2	4	3	10	8
<i>pagA</i>	4/0,1	2/0,05	3/0,3	2/0,2	3	2	4	3
<i>atxA</i>	1/0,02	0	0	0	0	0	1	1
<i>capA</i>	3/0,07	2/0,05	1/0,1	1/0,1	1	1	1	0
<i>capC</i>	2/0,05	0	0	0	1	1	1	0
<i>capD</i>	3/0,07	3/0,07	2/0,2	0	3	3	4	4
<i>acpA</i>	1/0,02	0	1/0,1	1/0,1	1	1	3	2
<i>ger XC</i>	1/0,02	1/0,02	2/0,2	2/0,2	1	1	1	1
<i>mprF</i>	2/0,05	1/0,02	2/0,2	2/0,2	2	1	23	1
<i>entFM</i>	2/0,05	2/0,05	1/0,1	1/0,1	0	0	17	5
<i>GBAA_RS16775</i>	1/0,02	1/0,02	2/0,2	2/0,2	0	0	132	31
<i>pIC</i>	0	0	1/0,1	1/0,1	1/0,1	1/0,1	9	3
<i>alo</i>	3/0,07	3/0,073	0	0	0	0	57	23
<i>nos</i>	0	0	2/0,2	2/0,2	0	0	32	9
<i>luxS</i>	0	0	0	0	1	1	8	0
<i>trpA</i>	0	0	3/0,3	1/0,1	0	0	18	5
<i>trpD</i>	0	0	1/0,1	1/0,1	1	0	15	4
<i>GBAA_RS06415 (trpG)</i>	0	0	1/0,1	1/0,1	1	1	14	5

the strains belonged to lineage A. Strains V770-NP-1R, Carbosap and all the strains of the Russian origin (Tsiankovskii-1, STI-1, 55VNIIViM, 228/8) had substitutions in gene *C*→*T* at the position 195 and 1799; in addition, the Tsiankovskii-1 strain had substitution 981 *A*→*T*. The same strains had substitution *A600V* in PA domain 4 in the receptor-binding region. No substitutions were detected in PA gene and protein in strains 34F2 Sterne, Brazilian vaccinal and A16R.

Capsular polyglutamate synthetase CapA: strains of lineage A had substitution *Q399K*; strains of lineage B had substitution *T345A*; lineage C strains had substitution *V156L*.

Capsule biosynthesis protein CapC: substitution *T80M* in strains of lineage C and *B. cereus* strains.

CapD gamma-glutamyl transferase: strains of lineage A had substitutions *I4M*, *V266I* and *S381E*; strains of lineage B did not have any substitutions; the strain of lineage C and *B. cereus biovar anthracis* strain CI had substitutions *H70Y*, *K223E* and *F379I*; *B. cereus biovar anthracis* strain CI had substitution *G499D*. Substitution *H70Y* was located in the L strand, substitution *F379I* — in the S strand.

Capsule synthesis transcriptional regulator AcpA: strains of lineages B and C and *B. cereus biovar anthracis* strain CI had substitution *E285K*; *B. cereus* also had substitution *Y354H*.

Anthrax toxin trans-activating transcriptional regulator AtxA: substitution *I188N* in *B. cereus biovar anthracis* strain CI.

Anthrolysin O (ALO): strains of the A.Br.Volum group had substitution *S422F*; strains of the A.Br. Aust94 group, which were isolated in South Africa, had substitution *N221T*; ; strains of the A.Br.005/006 group had substitution *V416G*.

Metalloprotease of the enhancin family: strains of lineage A had substitution *P631S*; strains of lineage B — substitution *L139F*; strains of lineage C — substitution *D444E*, the protein of *B. cereus biovar anthracis* strain CI had 29 substitutions.

GerXC spore germination protein: lineages A and B had substitution *H29R*; lineage B — substitution *T35I*, lineage C and *B. cereus biovar anthracis* — substitution *E219G*.

Protein production autoinducer-2, LuxS: lineage C had substitution *D111G*.

Bifunctional lysyl-phosphatidylglycerol flippase/synthetase MprF: lineage A had substitution *H631R*; lineage B — substitution *L289F*; lineages B and C as well as *B. cereus biovar anthracis* — substitution *V424I*.

Nitric oxide synthase NOS: lineage B — substitutions *Q288H* and *I348F*; *B. cereus biovar anthracis* — 9 substitutions.

Phospholipase C: strains of lineages B and C as well as *B. cereus biovar anthracis* had substitution H194Y; *B. cereus biovar anthracis* — had substitutions N20S and A59V.

Tryptophan synthase alpha subunit: lineage B — substitutions T222K and a non-functional protein in some strains of this lineage due to the deletion and formation of a pseudogene; *B. cereus biovar anthracis* — 5 substitutions.

Anthranilate phosphoribosyl transferase TrpD: lineage B — substitution N300S; *B. cereus biovar anthracis* — 4 substitutions.

Aminodeoxychorismate/anthranilate synthase component II, TrpG: Lineages B and C — substitution-sN300S; *B. cereus biovar anthracis* — 5 substitutions. H70Y is located in the L strand, F379I — in the S strand.

The obtained data on substitutions in plasmid genes and proteins of pathogenicity factors correlate with the data reported in earlier [22, 23]. Substitutions in genes of additional pathogenicity factors having chromosomal localization have been described by us for the first time.

The largest number of significant substitutions was identified in genes of enhancin and anthrolysin O in *B. cereus biovar anthracis* strain CI. In total, 19 pathogenicity factor genes had 15 significant substitutions in 38 strains of lineage A, 20 substitutions in 10 strains of lineage B, 20 substitutions in 1 strain of lineage C, 102 substitutions in *B. cereus biovar anthracis* strain CI. The consistency of pattern is observed: Strains from major lineages B and C, let alone, the *B. cereus biovar anthracis* strain, had significantly larger numbers of amino acid substitutions in pathogenicity factor proteins, which can change their functional activity, than strains from lineage A.

Sequence typing based on SNPs in pathogenicity factors genes

A total of 409 phylogenetically significant SNPs and 33 genotypes of pathogenicity factors were identified in 19 pathogenicity factor gene of 49 *B. anthracis* strains and 1 *B. cereus biovar anthracis* strain identified.

For the multi-virulence-locus sequence typing (MVLST), the Hunter–Gaston discriminatory index was 0.9633, being higher than the respective index for canSNP-typing (0.9056), coming close to the index for WGS-SNP typing (0.9869). Similar results were demonstrated by the comparative analysis of the MVLST and whole-genome SNP typing effectiveness [25]. Compared to canSNP and coreWGS-SNP typing, the MVLST typing based on SNPs of pathogenicity factor genes can be used for chromosomal and plasmid genes.

The dendrogram based on SNPs of pathogenicity factor genes also shows three universally recognized major genetic lineages: A, B, C of *B. anthracis* and the clade of the *B. cereus biovar anthracis* strain; the latter is basic for all the three major genetic *B. anthracis* lineages, while the clade of lineage C is basic for lineages

B and C (**Fig. 1**). These findings support the idea of the evolution of *B. anthracis* from its predecessor *B. cereus* to lineage C and then to lineages B and C; they can also suggest that variability of pathogenicity factor genes can be seen as a driving force of the evolution.

The phylogenetic relationships of strains, which were reconstructed using multilocus sequence typing, differed from those demonstrated by whole-genome SNP typing.

The canSNP group B.Br.001/002 and B.Br.Kruger clustering conformity was observed using multilocus sequence typing and whole-genome SNP typing.

The comparison of the dendrograms constructed with multilocus sequence typing and whole-genome SNP typing of the same strains (**Fig. 1**) showed that some strains belonging to other canSNP groups are clustered with strains from groups that do not conform to their canSNP-group affiliation.

Identification of clonal complexes using multilocus sequence typing

The identification of clonal complexes (CC) using multilocus sequence typing resulted in identification of 33 genotypes (GTs) comprising 5 clonal complexes for 48 *B. anthracis* strains of major lineages A and B as well as two distinct GTs for *B. anthracis* strains of lineage C and *B. cereus bv anthracis* (**Fig. 2**). CC1 is the most numerous complex consisting of 12 GTs of 20 strains.

CC1 includes GTs of 18 strains of 7 groups out of 14 canSNP groups from major genetic *B. anthracis* lineage A. CC2 consists of 2 GTs of the A.Br.008/011 group and serves as an intermediate link between CC1, CC4 having strains of lineage A and CC5 having strains of lineage B. CC3 includes 7 GTs from A.Br.Aust94, A.Br.001/002 and A.Br.Ames groups. CC4 consists of 5 GTs of the A.Br.008/011 group of major lineage A. CC5 includes 7 GTs of 10 strains from all canSNP groups of major *B. anthracis* lineage B.

In the clonal complexes, the genetic distances between GTs range from 1 to 6 units. All *B. anthracis* strains of lineage A are separated from strains of lineage B by the distance of 17 units (from GT17 to GT43), from the strain of lineage C — by the distance of 24 units (between GT7 and GT49), from the *B. cereus bv anthracis* strain (GT50) — by the distance of 340 units from the *B. anthracis* strain of lineage C (GT49).

The analysis of the clonal complexes confirms that *B. anthracis* strains are classified into three major genetic lineages and are distributed by genotypes of pathogenicity factor genes, which do not demonstrate complete conformity to canonical SNP groups. The analysis confirms the evolution of pathogenicity factors from *B. cereus biovar anthracis* to *B. anthracis* of lineage C and then to lineages A and B, thus making it possible to identify genetic groups different from canonical SNP groups.

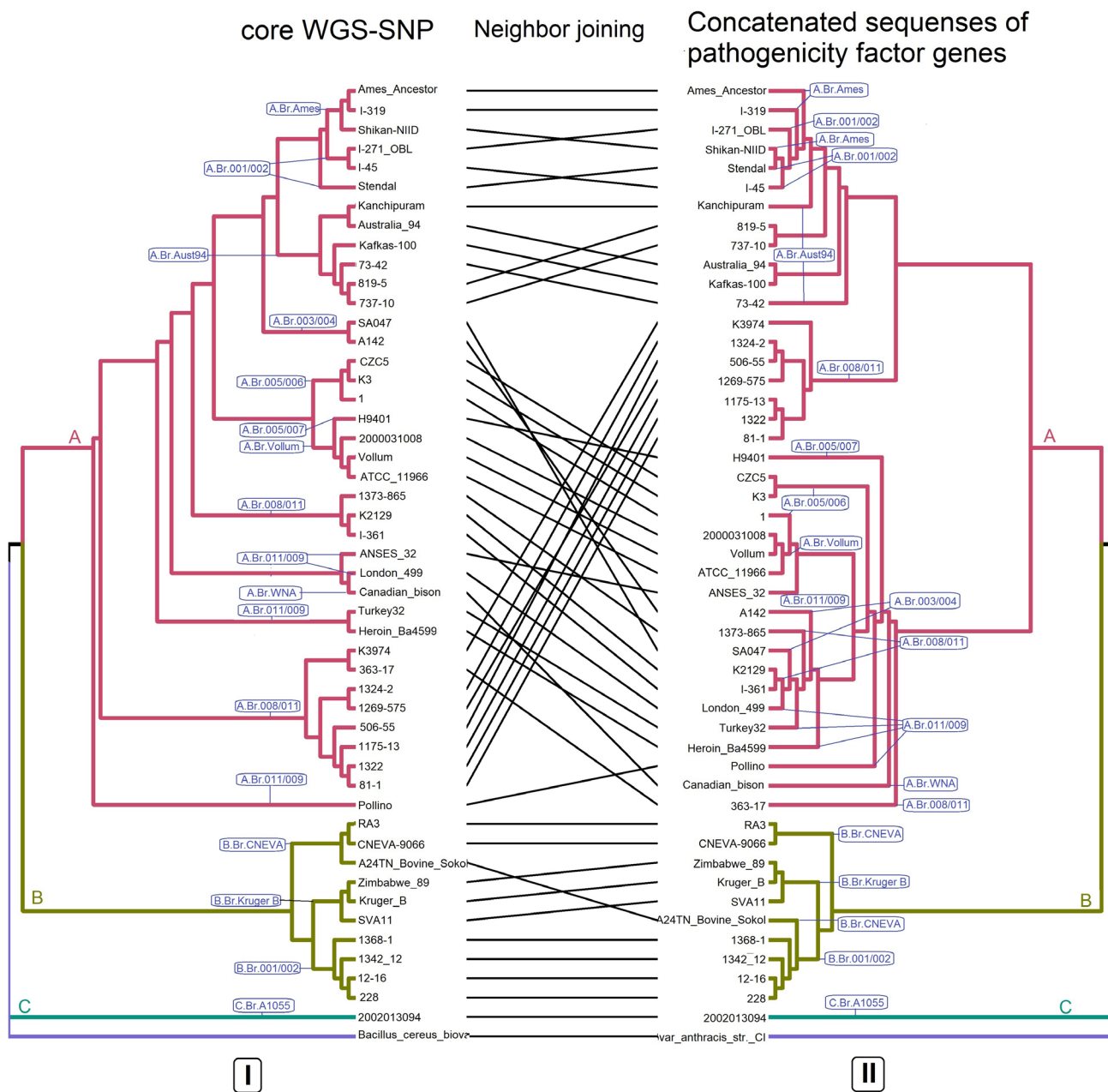


Fig. 1. Comparison of the phylogenetic reconstruction of the results received using the multilocus sequence typing and coreWGS-SNP.

Discussion

The number of all types of polymorphisms in the chromosomal region of genomes in *B. anthracis* strains of lineages B and C was 1.6-13.4 times and in the *B. cereus* var. *anthracis* strain 5-150 times as large as their number in *B. anthracis* strains of lineage A. Especially significant differences were observed in the numbers of substitutions, SNPs, and indels in the genome of the *B. cereus* var. *anthracis* strain, which were 785.7, 150 and 27 times as large as their numbers in *B. anthracis* strains of lineage A. These differences can be explained by the conformity between the chromosomal region of the genome of *B. cereus* var. *anthracis* strains and the genome of representatives of the *B. cereus sensu*

lato group, except for *B. anthracis*, while pCI-XO1 and pCI-XO2 plasmids do not differ significantly from pXO1 and pXO2 plasmids of *B. anthracis* [4].

The number of chromosomal specific marker SNPs per genome had an inverse relationship with the number of lineage strains; for the only strain of major lineage C, this number was 24 times as large as the number for 10 strains of lineage B and exceeded 170 times the number for 38 strains of lineage A. This phenomenon can result from a longer evolution history involving accumulation of mutations in genetic lineages B and C compared to lineage A. As SNPs were located primarily in housekeeping genes, there is a high probability that these mutations were significant and could

GT	Strains	canSNP group	GT	Strains	canSNP group
GT1	Ames_Ancesor	A.Br.Ames	GT20	1175-13	A.Br.008/011
	Shikan-NIID	A.Br.Ames		1322	A.Br.008/011
	I-319	A.Br.Ames	GT21	1324	A.Br.008/011
	I-45	A.Br.001/002	GT22	363-17	A.Br.008/011
	I-271_OBL_	A.Br.001/002	GT19	506-55	A.Br.008/011
GT6	Stendal	A.Br.001/002	GT11	CZC5	A.Br.005/006
GT30	Kafkas-100	A.Br.AuGT94	GT34	Vollum	A.Br.Vollum
	Australia_94	A.Br.AuGT94		ATCC_11966	A.Br.Vollum
GT27	73-42	A.Br.AuGT94		GT38	Canadian_bison
GT28	737-10	A.Br.AuGT94	GT37	2000031008	A.Br.Vollum
GT29	819-5	A.Br.AuGT94	GT10	1	A.Br.005/006
GT7	SA047	A.Br.003/004	GT36	H9401	A.Br.005/007
	A142	A.Br.003/004	GT9	K3	A.Br.005/006
	London_499	A.Br.011/009	GT43	RA3	B.Br.CNEVA
	K2129	A.Br.008/011		CNEVA-9066	B.Br.CNEVA
	1373-865	A.Br.008/011		228	B.Br.001/002
	I-361	A.Br.008/011	GT39	12-16	B.Br.001/002
	Turkey32	A.Br.011/009		1342_12	B.Br.001/002
	Heroin_Ba4599	A.Br.011/009		GT42	1368-1
GT12	ANSES_32	A.Br.011/009	GT45	A24TN_Bovine_Sokol	B.Br.CNEVA
GT33	Polino	A.Br.011/009	GT46	Kruger_B	B.Br.Kruger B
GT17	K3974	A.Br.008/011	GT48	SVA11	B.Br.001/002
GT18	81-1	A.Br.008/011	GT47	Zimbabwe_89	B.Br.001/002
GT23	1269	A.Br.008/011	GT49	2002013094	C.Br.A1055
GT32	Kanchipuram	A.Br.Aust94	GT50	Bacillus_cereus_biovar anthracis str. CI	B. c. bv anthr

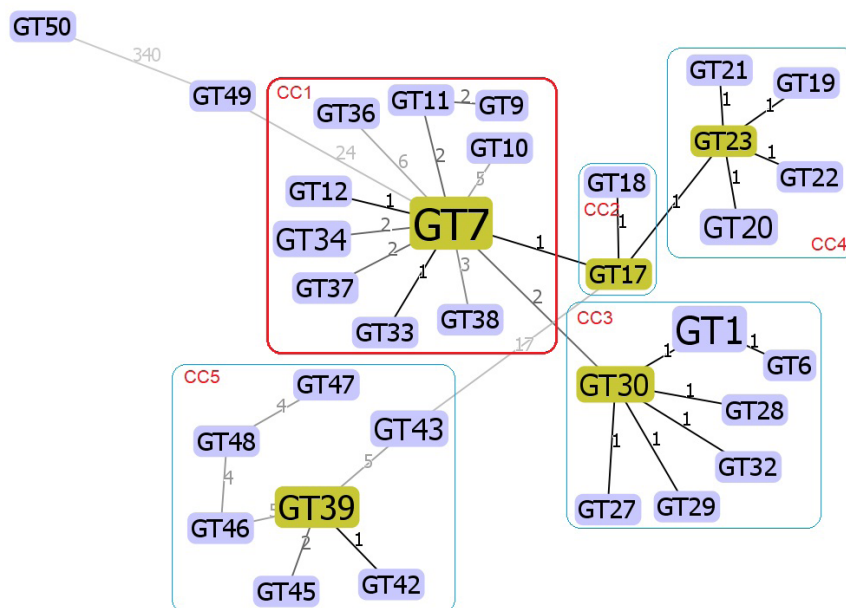


Fig. 2. Clonal complexes of *B. anthracis* strains. The dendrogram was constructed using multilocus sequence typing and the goeBURST Full MST algorithm in the PHYLOViZ 2.0 program; numbers on the clades correspond to genetic distances.

affect the ecological adaptation of lineages B and C, consequently, their limited spread.

The variability of 19 pathogenicity factor genes, out of which 9 were encoded by pXO1 and pXO2 plasmids of *B. anthracis* or pCI-XO1 and pCI-XO2 of *B. cereus biovar anthracis*, and another 10 — by a chromosome, was manifested by the presence of SNPs and indels. It should be noted that no indels have been detected in *B. anthracis* strains from lineage A, except for the strain 2000031008, as opposed to other lineages. In strains of lineages B and C, insertion ATATAGATA in the *acpA* gene caused the insertion of 3 amino acids NID (asparagine-isoleucine-aspartic acid) in the capsule synthesis transcriptional regulator AcpA. This insertion, a tandem repeat unit, was described as a new VNTR-locus first in our publication [26] and later by other authors [23]. The deletion in the 107–124 bp region in the *trpA* gene turned it into a pseudogene, deprived the TrpA tryptophan synthase alpha subunit of 35–40 N-terminal amino acids and made the enzyme nonfunctional in most of the strains of lineage B, which we have studied. These effects could explain the dependence of these strains on tryptophan [16].

PA is the main immunogenic component of anthrax vaccines. All vaccine strains of live vaccines as well as strains, PA of which is used in chemical vaccines, belonged to major genetic lineage A. Vaccine strains of Russian origin, strains V770-NP-1R and Carbosap have the alanine-to-valine substitution in the receptor-binding region of PA domain 4, which is absent in vaccine strains from China, Brazil and in the 34F2 Sterne strain used for vaccination of livestock in Western countries. These data can be useful in development of new anthrax vaccines.

The global dominance of genotypes of lineage A serves as a proof of a bid reproductive success (and, consequently, adaptation) and considerable dispersion over large distances [27]. Smith *et al.* assume that strains of lineage A, though not lineage B, have a hypothetical ability to cause latent infection in animals, which is associated with their global distribution and the restricted distribution of lineage B. The comparison of isolates from lineages A and B from South Africa showed that strains A were adapted to more diverse environments than strains B, which were restricted by narrower environments [28]. The limited number and restricted geographical distribution of rarer lineages can be caused by higher adaptation costs, which are associated with niche specialization [29].

The genotypes from lineage C and, to a lesser extent, from lineage B, apparently have a very poor adaptation compared to the genotypes from lineage A. Indeed, the clade of lineage C is characterized by significantly slower rates of evolution than the clade of lineage A, implying the smaller number of infectious cycles in nature [1].

The differences between evolutionary lineages in terms of susceptible hosts can also contribute to differences in their distribution. Strains of the B.Br.CNEVA group of lineage B were reported only in France, Southern Germany, Switzerland, Northern Italy, Bosnia and Herzegovina, Croatia, Slovenia, Slovakia and Poland. They constitute a transalpine axis represented by valley grasslands with rich meadows, traditionally focusing on specific breeds of cattle, which were kept isolated and were not exchanged for centuries. Such geographic isolation might have provided favorable environment for spore survival and replication of *B. anthracis* of the B.Br.CNEVA group [2, 30].

Conclusion

There are significant differences in the numbers of polymorphisms in genomes of representatives of major genetic *B. anthracis* lineages A, B and C. Strains of the most geographically restricted lineage C had 4.5 times and strains of lineage B, which is also quite restricted, 3 times as many types of polymorphisms compared to strains of numerous lineage A. The dominating location of nucleotide substitutions, including significant substitutions, within housekeeping genes and pathogenicity factors could contribute to changes in functions of respective proteins. The expansion of lineage A can be explained by its advantages over lineages B and C, which were established during the evolution. Lineage C, which is evolutionary older and is primary in relation to lineages B and A as well as least adapted, is restricted in distribution by negative selection. The evolution of *B. anthracis*, which is associated with the variability of pathogenicity factors, helps identify genetic groups that are different from canonical SNP groups. MVLST having a good discriminatory power can be used as an additional method of molecular typing of the anthrax pathogen, making it possible to differentiate strains using pathogenicity determinant.

In our study, we, for the first time, found that strains of lineages B and C have significantly higher numbers of polymorphisms in genomes, including pathogenicity factor genes, compared to lineage A. We identified significant substitutions in chromosomal and plasmid genes, which have a potential effect on virulence, and demonstrated a high discriminatory power of MVLST) using the analysis of SNPs of 19 pathogenicity factor genes. For the first time, the mechanism underlying the tryptophan dependence in some *B. anthracis* strains of lineage B was identified, demonstrating its association with mutations in the gene of the tryptophan synthase alpha subunit.

The variability of genes associated with spore germination and spore formation should be studied further, as they can also have an impact on adaptation and distribution of the genetic lineages of *B. anthracis*.

Thus, the dominance of major genetic lineage A of *B. anthracis* can be explained, among other versions, by

a significantly smaller numbers of genomic mutations compared to B and, especially, C lineages as well as by its better adaptation to external and host environments.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Pearson T., Busch J.D., Ravel J., et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004;101(37):13536–41. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0403844101>
- Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018;64:115–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024>
- Leendertz F.H., Ellerbrok H., Boesch C., et al. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature*. 2004;430(6998):451–2. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02722>.
- Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010;5(7):e10986. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010986>
- Okinaka R.T., Cloud K., Hampton O., et al. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* 1999;181(20):6509–15. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6509-6515.1999>
- Harrington R., Ondov B.D., Radune D., et al. Genome sequence of the attenuated CarboSap vaccine strain of *Bacillus anthracis*. *Genome Announc.* 2013;1(1):e00067-12. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.00067-12>
- Sirard J.C., Guidi-Rontani C., Fouet A., Mock M. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis* toxin production and pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000;290(4-5):313–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80030-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80030-2)
- Heffernan B.J., Thomason B., Herring-Palmer A., et al. *Bacillus anthracis* phospholipases C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. *Infect. Immun.* 2006;74(7):3756–64. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00307-06>
- Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., et al. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008;105(3):1009–13. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0710950105>
- Samant S., Hsu F.F., Neyfakh A.A., Lee H. The *Bacillus anthracis* protein MprF is required for synthesis of lysylphosphatidylglycerols and for resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 2009;191(4):1311–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01345-08>
- Lepore L.S., Roelvink P.R., Granados R.R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* 1996;68(2):131–40. DOI: <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0070>
- Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N., et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*. 2003;423(6935):81–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01586>
- Jones M.B., Blaser M. Detection of a luxS-signaling molecule in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 2003;71(7):3914–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3914-3919.2003>
- Shannon J.G., Ross C.L., Koehler T.M., Rest R. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect. Immun.* 2003;71(6):3183–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.71.6.3183-3189.2003>
- Tran S.L., Guillemet E., Gohar M., et al. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J. Bacteriol.* 2010;192(10):2638–42. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01315-09>
- Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А. и др. Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; (2):53–6. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova E.A., et al. Genotypic peculiarities of *Bacillus anthracis* strains with different manifestation of pathogenicity-associated features. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(2):53–6. EDN: <https://elibrary.ru/mstsjxj>
- Cao S., Guo A., Wu G., et al. Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. *J. Bacteriol.* 2010;192(21):5799–805. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00485-10>
- Klimpel K.R., Arora N., Leppla S.H. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol.* 1994;13(6):1093–100. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x>
- Tonello F., Naletto L., Romanello V., et al. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;313(3):496–502. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.134>
- Price L.B., Hugh-Jones M., Jackson P.J., Keim P. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 1999;181(8):2358–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.181.8.2358-2362.1999>
- Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г. и др. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(1):94–9. Kulichenko A.N., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., et al. Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets autonomous district in 2016. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(1):94–9. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-94-99> EDN: <https://elibrary.ru/yixyqj>
- Goncharova Y., Bahtejeva I., Titareva G., et al. Sequence variability of pXO1-located pathogenicity genes of *Bacillus anthracis* natural strains of different geographic origin. *Pathogens*. 2021;10(12):1556. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10121556>
- Goncharova Y.O., Bogun A.G., Bahtejeva I.V., et al. Allelic polymorphism of anthrax pathogenicity factor genes as a means of estimating microbiological risks associated with climate change. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022;58(4):382–93. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683822040056>
- Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(11):2465–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
- Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В. и др. Сравнительный анализ методов генетического типирования *Bacillus anthracis*. *Генетика*. 2019;55(1):40–51. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., et al. Comparative analysis of genotyping methods for *Bacillus anthracis*. *Russian Journal of Genetics*. 2019;55(1):35–44. DOI: <https://doi.org/10.1134/S102279541901006X> EDN: <https://elibrary.ru/jshceda>

26. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В. и др. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(3):43–50. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., et al. New genetic markers for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(3):43–50.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-43-50>
EDN: <https://elibrary.ru/pgefkd>
27. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007;2(5):e461.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
28. Smith K.L., DeVos V., Bryden H., et al. *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(10):3780–4.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3780-3784.2000>
29. Kassen R., Llewellyn M., Rainey P.B. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature*. 2004;431(7011):984–8.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02923>
30. Derzelle S., Aguilar-Bulteta L., Frey J. Whole genome SNP analysis of bovine *B. anthracis* strains from Switzerland reflects strict regional separation of *Bacillus anthracis* and Swiss Brown breeds in the past. *Vet. Microbiol.* 2016;196:1–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.014>

Information about the authors

Evgeny I. Eremenko — D. Sci. (Med.), Prof, Chief Scientist, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, ejer@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>.

Grigori A. Pechkovskii — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

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

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

Dmitry A. Kovalev — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Lyudmila Yu. Aksenova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

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

Alexander N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

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

The article was submitted 21.03.2023;
accepted for publication 29.05.2023;
published 28.06.2023

Информация об авторах

Еременко Евгений Иванович — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, ejer@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>

Печковский Григорий Александрович — м.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

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

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

Ковалев Дмитрий Анатольевич — к.х.н., зав. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

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

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

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

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

Статья поступила в редакцию 21.03.2023;
принята к публикации 29.05.2023;
опубликована 28.06.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-374>



Разнообразие CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их ассоциация с факторами патогенности возбудителя

Перетолчина Н.П.^{1,✉}, Воскресенская Е.А.², Кокорина Г.И.², Богумильчик Е.А.²,
Климов В.Т.³, Трухачев А.Л.⁴, Джигоев Ю.П.¹, Злобин В.И.^{1,5}

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

³Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия;

⁴Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия;

⁵Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Постоянный обмен наследственной информацией с участием внехромосомных и транспозируемых элементов является одним из факторов существования гетерогенных популяций микроорганизмов. Структуры, контролирующие горизонтальный перенос генов, могут влиять на формирование генетических вариантов патогенов.

Цель работы — изучить молекулярно-генетические характеристики CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, циркулирующих на территории России, и их связь с факторами патогенности возбудителя псевдотуберкулёза.

Материалы и методы. В работе изучены 56 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных в течение 1935–2014 гг. на различных территориях России и других государств из разных источников. Выделение и амплификацию фрагментов ДНК, содержащих CRISPR-локусы, выполняли методом полимеразной цепной реакции. Секвенирование CRISPR-локусов осуществляли по методу Сэнгера. Для каждого штамма определён генотип по наличию основных факторов патогенности: хромосомных генов суперантигена *ypmA/C*, генов, локализованных на «островах патогенности» HPI, YAPI, генов плазмиды pYV, pVM82.

Результаты. В результате анализа CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* установлено, что спейсерный состав локусов различается у штаммов, отличающихся серотипом, набором факторов патогенности, регионом выделения. Наиболее вариабельны локусы YP1 и YP3, локус YP2 однороден. Состав локуса YP1 различается в группах штаммов, отличающихся по наличию плазмиды pVM82. Состав локуса YP3 зависит и от наличия плазмиды pVM82, и от «адгезивного острова патогенности» YAPI.

Заключение. На территории России циркулируют штаммы *Y. pseudotuberculosis* с различным набором детерминант вирулентности и спейсерным составом CRISPR-локусов. Большинство российских штаммов отличаются по данным молекулярным маркерам от штаммов из других стран. Высокая вариабельность штаммов внутри вида определяется способностью приобретать новые генетические элементы путём горизонтального переноса генов. CRISPR-Cas как система «иммунитета» бактерий против мобильных генетических элементов может участвовать в формировании патогенного потенциала штаммов *Y. pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: CRISPR-локус, факторы патогенности, *Yersinia pseudotuberculosis*

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

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

Для цитирования: Перетолчина Н.П., Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А., Климов В.Т., Трухачев А.Л., Джигоев Ю.П., Злобин В.И. Разнообразие CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их ассоциация с факторами патогенности возбудителя. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):166–175.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-374>

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

Diversity of CRISPR loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their association with pathogenicity factors

Nadezhda P. Peretolchina^{1✉}, Ekaterina A. Voskresenskaya², Galina I. Kokorina², Elena A. Bogumilchik², Valery T. Klimov³, Alexey L. Trukhachev⁴, Yuri P. Dzhioev¹, Vladimir I. Zlobin^{1,5}

¹Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia;

²St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

³Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia;

⁴Rostov-on-Don Antiplague Institute, Rostov-on-Don, Russia;

⁵National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Heterogeneous microbial populations exist in the nature due to exchange of genetic material containing in extrachromosomal and transposable elements. Structures controlling horizontal gene transfer may affect development of pathogen genetic variants.

The **aim** of the study is to analyze molecular genetic characteristics of CRISPR-loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains circulating in Russia and their association with pathogenicity factors.

Materials and methods. We studied 56 strains of *Y. pseudotuberculosis* isolated from different sources in Russia during 1935–2014 from various sources in different regions of Russian Federation and in other countries. DNA fragments with CRISPR-loci were isolated and amplified by PCR, and subjected to Sanger sequencing. PCR was used to determine chromosomal genes of superantigen *ypmA/C*, pathogenicity islands HPI, YAPI, and plasmids pYV and pVM82.

Results. Analysis of CRISPR-loci in *Y. pseudotuberculosis* showed that spacer content varies in strains depending on serotype, set of pathogenicity factors, and isolation place. The most variable loci are YP1 and YP3, locus YP2 is homogeneous. Locus YP1 varies in strains that differ by presence of plasmid pVM82, while content of locus YP3 depends on presence of plasmid pVM82 and adhesion pathogenicity island YAPI.

Conclusion. Strains of *Y. pseudotuberculosis* circulating in Russia have a huge diversity of pathogenicity factors and CRISPR spacer content. Most of Russian strains differ by molecular markers from strains isolated in other countries. High variability is defined by ability to get new genetic elements in horizontal gene transfer. In bacteria, CRISPR-Cas system provides «immunity» against mobile genetic elements and can participate in formation of *Y. pseudotuberculosis* pathogenic potential.

Keywords: CRISPR-locus, pathogenicity factors, *Yersinia pseudotuberculosis*

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

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

For citation: Peretolchina N.P., Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumilchik E.A., Klimov V.T., Trukhachev A.L., Dzhioev Yu.P., Zlobin V.I. Diversity of CRISPR loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their association with pathogenicity factors. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):166–175. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-374> EDN: <https://www.elibrary.ru/ornkhs>

Введение

Грамотрицательные бактерии вида *Yersinia pseudotuberculosis* относят к факультативным психрофилам, способным вызывать острое сапрозоонозное заболевание — псевдотуберкулёз [1]. Случаи псевдотуберкулёза регистрируют во многих субъектах России, но регионами с наиболее высокой заболеваемостью являются Дальневосточный, Северо-Западный и Сибирский федеральные округа. Классические методы типирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* основаны на определении

серотипа [2, 3]. Большинство циркулирующих на территории России штаммов относятся к серотипу O:1, преимущественно O:1b, в сибирском регионе также выявлены представители серотипа O:3, на Дальнем Востоке, кроме перечисленных, встречаются штаммы серотипа O:3, O:4 [4, 5]. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* отличаются высоким разнообразием факторов, определяющих их вирулентность и тяжесть вызываемого ими заболевания. Хромосомные факторы патогенности *Y. pseudotuberculosis*, выявляемые методом полимеразной цепной

реакции (ПЦР) включают гены суперантигена *уртА*, *уртС*, «острова патогенности» НР1 («остров высокой патогенности») и YAPI («адгезивный остров патогенности»). На плаزمиде рУУ и рVM82 локализованы гены, ассоциированные с факультативным внутриклеточным паразитизмом бактерии: аппарат секреции III типа, адгезины и аппарат секреции IVB типа. Но данные методы типирования не позволяют дифференцировать близкородственные штаммы внутри одного серотипа или генотипа с определёнными факторами патогенности. В зависимости от последующего метода генотипирования, основанного на анализе геномного полиморфизма штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выявляется различное число генотипов, отличающихся серотипом, географией и источником выделения, патогенным потенциалом [6, 7]. Применение нескольких методов генотипирования позволяет получить более информативные результаты.

Постоянный обмен наследственной информацией с участием внехромосомных и транспозируемых элементов является одним из факторов существования гетерогенной популяции микроорганизмов в определённых условиях среды [1]. Некоторые кластеры генов, кодирующие детерминанты патогенности, ассоциированы с интегразами профагов или инсерционными элементами, контролирующими геномные перестройки, следовательно, системы, направленные на регуляцию горизонтального переноса генов, влияют на эволюцию бактерий. К таким структурам относится система CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, короткие палиндромные повторы, разделённые спейсерами), способная специфически узнавать и уничтожать чужеродный генетический материал.

CRISPR-Cas-системы *Y. pseudotuberculosis* относятся к классу 1, типу I и подтипу F (IF), и имеют в своём составе от одного до 3 локусов (YP1, YP2 и YP3), удалённо расположенных относительно друг друга вследствие геномных перестроек. Cas-гены локализованы около одной из кассет (YP1), представленных в геноме иерсиний. Остальные локусы (YP2 и YP3) являются производными локуса YP1 и сохраняют способность функционировать в качестве CRISPR-иммунитета [8, 9]. Ранее К.А. Koskela и соавт., Т. Seehagran и соавт. обнаружили соответствие между некоторыми сиквенс-типами и спейсерным составом CRISPR-кассет штаммов *Y. pseudotuberculosis* [9, 10].

Но в работах, посвящённых изучению CRISPR-Cas-системе *Y. pseudotuberculosis*, штаммы, изолированные на территории России, представлены в относительно небольших количествах, а также отсутствует информация о месте выделения штамма и другие паспортные данные.

Целью настоящего исследования явилось изучение молекулярно-генетических характеристик CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на территории России, и их связи с факторами патогенности.

Материалы и методы

Изучены 56 штаммов *Y. pseudotuberculosis* [11], выделенные в течение 1935–2014 гг. на территории

Восточной и Западной Сибири, Дальнего Востока, Северо-Западного и других регионов России, Монголии, Украины, Беларуси, Туркменистана и Абхазии из различных источников (см. Приложение на сайте журнала).

Штаммы отобраны из коллекций Иркутского НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Ростовско-го-на-Дону научно-исследовательского противочумного института с учётом имеющихся паспортных данных в соответствии с полученными ранее данными о длине CRISPR-локусов [11].

Для выделения ДНК из коллекционных штаммов использовали комплект реагентов «Рибо-сорб» («AmpliSens») и «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио»). ПЦР проводили на амплификаторе компании «Applied Biosystems» и на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «ДНК-Технология»). Для выделения и секвенирования CRISPR-локусов использовали праймеры и методику, представленные ранее [11].

Выявление хромосомных генов суперантигена *уртА/С*, генов, локализованных на «островах патогенности» НР1 (*fyuA*, *irp2*), YAPI (*pilPQ*, *api74*, *tcp*), генов плазмиды рVM82 (*dotO*, *musAB*) проводили методом ПЦР [12].

Серотип исследуемых штаммов определяли по общепринятой методике с диагностическими сыворотками производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и методом мультиплексной ПЦР [2, 3].

Секвенирование CRISPR-локусов осуществляли по Сэнгеру на капиллярном секвенаторе «Applied Biosystems 3500» («Thermo Scientific»). Для 10 штаммов провели полногеномное секвенирование на секвенаторе MiSeq («Illumina»). Пробоподготовку и секвенирование проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Сборку и анализ фрагментов проводили с помощью программ «Vector NTI Advance 10.3» и «BioEdit 7.2». Сборку до уровня контигов реализовывали с помощью геномного сборщика SPAdes 3.15.4 и инструмента CONTIGuator 2.7.4, осуществляющего финишную сборку на основе референсного генома [13, 14]. Поиск и расшифровку CRISPR-Cas-систем в последовательностях штаммов проводили с использованием программ «CRISPRone»¹, «CRISPRCasFinder»² и «CRISPRDetect»³ [15–17]. Гомологичные протоспейсерные последовательности в геномах бактериофагов и плазмид определяли с помощью алгоритма поиска BLASTn по базам данных GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, RefSeq, онлайн-приложения CRISPRTarget по базам данных GenBank-Phage, RefSeq-Plasmid и Islandviewer [18, 19]. Гомологичные последовательности искали с использованием следующих критериев: наличие 3'-PAM, характерного для CRISPR-систем типа IF — GG, не более 2 несоответствий комплементарных оснований, отсутствие более 2 спаренных нуклеотидов подряд. Профаги в геномах хро-

¹ URL: <https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/>

² URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr>

³ URL: <http://brabtools.com/CRISPRDetect>

мосом определяли с использованием онлайн-инструмента PHASTER [20].

Анализ данных проводили в среде программирования RStudio 2022.07.1+554 с использованием языка для статистической обработки данных и работы с графикой R 4.2.2 [21]. Пермутационный дисперсионный анализ (PERMANOVA) использовали для поиска статистически значимых различий в строении локусов и их связи с различными характеристиками штаммов в составе пакета vegan 2.6-4 [22]. Кластеризацию штаммов и построение дендрограмм по наличию спейсеров проводили с использованием пакетов pvclust 2.2-0 и ComplexHeatmap 2.14.0 по методу невзвешенного попарного среднего (UPGMA) с бутстрепом 1000 [23].

Регистрационные номера последовательностей 69 нуклеотидных последовательностей CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* депонированы в международную базу GenBank (номера доступа: KX592595–KX592599 и OP245022–OP245086).

Результаты

В результате анализа качества и сборки сиквенсов отобраны 78 фрагментов. Показано, что исследованные штаммы *Y. pseudotuberculosis* содержат CRISPR-Cas-систему, включающую 1–3 локуса: YP1, YP2, YP3. Согласно структуре повторов (5'-GTT CAC TGC CGC ACA GGC AGC TTA GAA A-3') все локусы относятся к типу IF. Общее количество спейсеров составило 1311. В локусе YP1 количество спейсеров варьирует от 3 до 38 (всего 810 спейсеров), в локусе YP3 — от 1 до 44 (всего 466), локус YP2 — короткий и состоит из 1 или 2 спейсеров.

Спейсерный состав CRISPR-локусов

Для анализа спейсерного состава CRISPR-локусов была создана база данных спейсеров штаммов *Y. pseudotuberculosis* (№ 2020622813, зарегистрирована в Государственном реестре баз данных, 25.12.2020).

Статистически достоверно спейсерный состав CRISPR-Cas-систем различается у штаммов, отличаю-

Различия спейсерного состава CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* (при $p < 0,05$)
Differences of spacer content in CRISPR-loci of *Y. pseudotuberculosis* strains ($p < 0,05$)

Характеристика штамма Strain characteristics	Df	MS	Pseudo-F	p
Локус YP1 Locus YP1				
Регион выделения Isolation place	22	0,4668	3,9483	0,001
Серотип Serotype	1	0,6831	5,7779	0,001
Сочетание факторов патогенности Combination of pathogenicity factors	3	0,554	4,6857	0,001
pVM	1	0,4659	3,9408	0,002
YAPI	1	0,2125	1,7976	0,089
Другие факторы Other factors	10	0,1182		
Локус YP2 Locus YP2				
Регион выделения Isolation place	13	0,1869	3,3647	0,215
Серотип Serotype	3	0,0664	1,1944	0,420
Другие факторы Other factors	3	0,0556		
Локус YP3 Locus YP3				
Регион выделения Isolation place	20	0,4439	36,117	0,001
Серотип Serotype	3	0,4352	35,402	0,001
Сочетание факторов патогенности Combination of pathogenicity factors	3	0,5478	44,567	0,001
pVM	1	0,1984	16,145	0,001
YAPI	1	0,3016	24,537	0,001
Другие факторы Other factors	7	0,0123		
Все локусы All loci				
Регион выделения Isolation place	27	0,555	2,6799	0,001
Серотип Serotype	4	0,3906	1,8858	0,001
Сочетание факторов патогенности Combination of pathogenicity factors	3	0,5049	2,4379	0,001
pVM	1	0,5279	2,5487	0,007
YAPI	1	0,2454	1,185	0,276
Другие факторы Other factors	19	0,2071		

Примечание. Df — степени свободы; MS — средний квадрат; Pseudo-F — оценка критерия Фишера; p — оценка уровня значимости.
Note. Df — degree of freedom; MS — mean square; Pseudo-F — Fisher criterion; p — significance level.

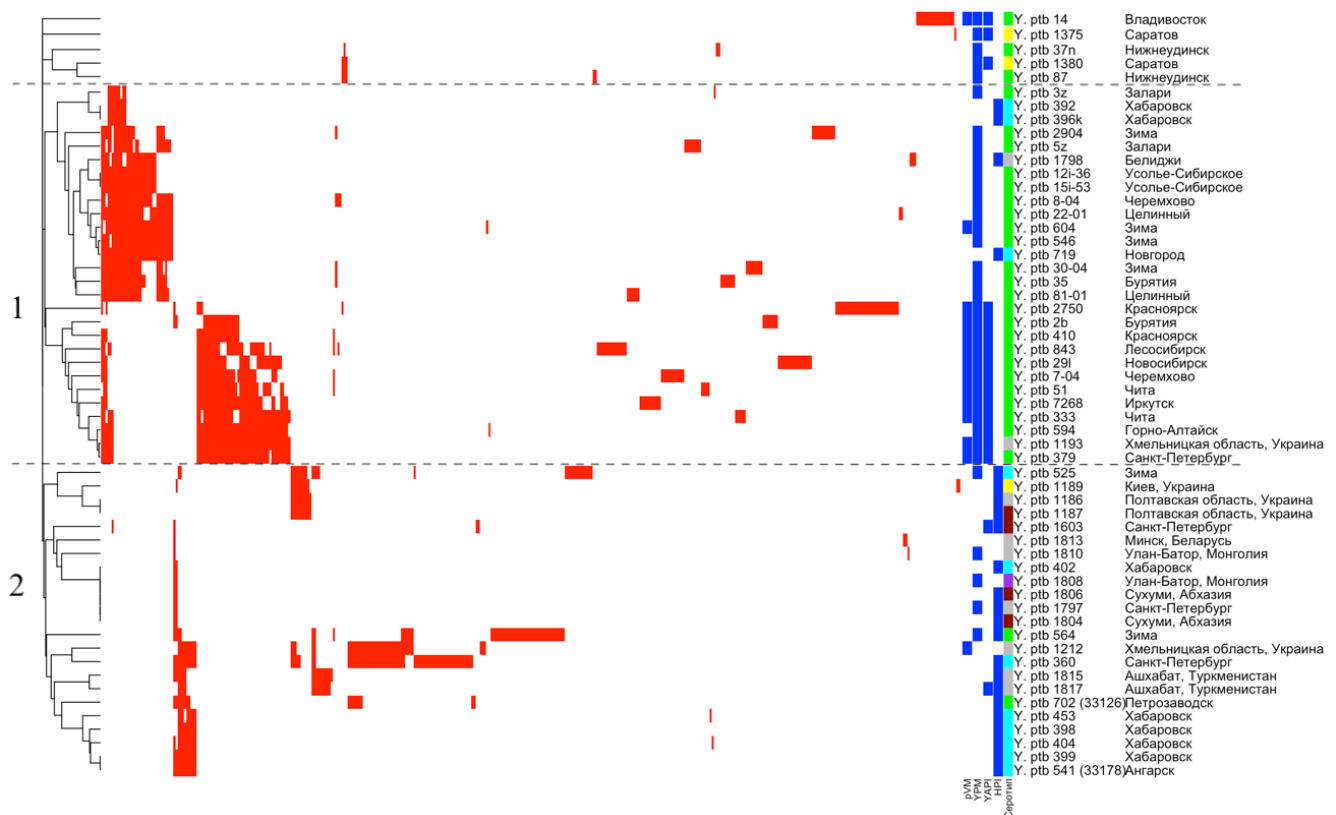


Рис. 1. Кластеризация штаммов *Y. pseudotuberculosis* ($n = 56$) по наличию спейсеров в локусах YP1–YP3.

Условное обозначение по цветам: наличие спейсера — красный; наличие фактора патогенности — синий; серотип 1 — тёмно-красный; серотип 1a — голубой; серотип 1b — зелёный; серотип 3 — жёлтый; серотип 4 — фиолетовый; серотип не определён — серый.

Fig. 1. Clusterization of *Y. pseudotuberculosis* strains ($n = 56$) by presence of spacer in loci YP1–YP3.

Color designations: presence of spacer — red; presence of factor — blue; serotype 1 — darkred; serotype 1a — cyan; serotype 1b — green; serotype 3 — yellow; serotype 4 — violet; serotype is not defined — grey.

щихся серотипом, набором факторов патогенности, выделенных на разных территориях (таблица). При изучении отдельных локусов статистически достоверно различаются составы локусов YP1 и YP3, состав локуса YP2, напротив, достаточно однороден. Спейсерный состав локуса YP1 отличается у штаммов разных серотипов и генотипов, в частности, у штаммов с различным плазмидным составом (pVM82⁺ или pVM82⁻). Состав локуса YP3, в отличие от локуса YP1, достоверно отличается у штаммов, имеющих в составе генома «адгезивный остров патогенности» YAP1 и плазмиду pVM82. Статистически достоверных различий в группах штаммов, отличающихся по остальным факторам патогенности (суперантиген YPM, «остров патогенности» HPI), не выявлено.

Кластерный анализ штаммов, основанный на наличии спейсеров в локусах, позволяет условно разделить штаммы на 2 большие группы (рис. 1).

Кластер 1 включает 28 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных преимущественно на территориях Сибирского федерального округа (86%): 3 штамма серотипа O:1a, 23 штамма серотипа O:1b (для 2 штаммов серотип не определён). Для штаммов характерно наличие суперантигена YPM (89%). При этом внутри кластера происходит разделение штаммов на 2 подкла-

стера по наличию «адгезивного острова патогенности» YAP1 и плазмиды pVM82: подкластер 1–1 (YPM⁺YAP1⁻pVM82⁻) включает 16 (57%) штаммов, подкластер 1–2 (YPM⁺YAP1⁺pVM82⁺) — 12 (43%) штаммов.

Кластер 2 состоит из 23 штаммов *Y. pseudotuberculosis* разных серотипов, практически в равных долях выделенных в различных регионах России (52%) и других государств (48%). Для большинства штаммов характерно наличие «острова патогенности» HPI (83%), 5 (22%) штаммов обладают суперантигеном YPM, 1 (4%) штамм — «адгезивным островом патогенности» YAP1, 1 (4%) штамм — плазмидой pVM82.

Пять (9%) из изученных 56 штаммов (14, 1375, 37п, 1380, 87) находятся вне основных кластеров. Спейсеры, представленные в данных штаммах, практически не встречаются в других CRISPR-системах.

Сравнительный анализ полученных сиквенсов с последовательностями геномов, депонированных в базах данных NCBI (Genbank и RefSeq), показал разделение штаммов на «европейскую» (группа 1) и «азиатскую» (группа 2) клады (рис. 2).

В группу 1 вошли 52 штамма, выделенных преимущественно на территории России и Японии (73%). Также встречаются штаммы (15%), выделенные в различных странах: Германии, Южной Африке, Туркменистане,

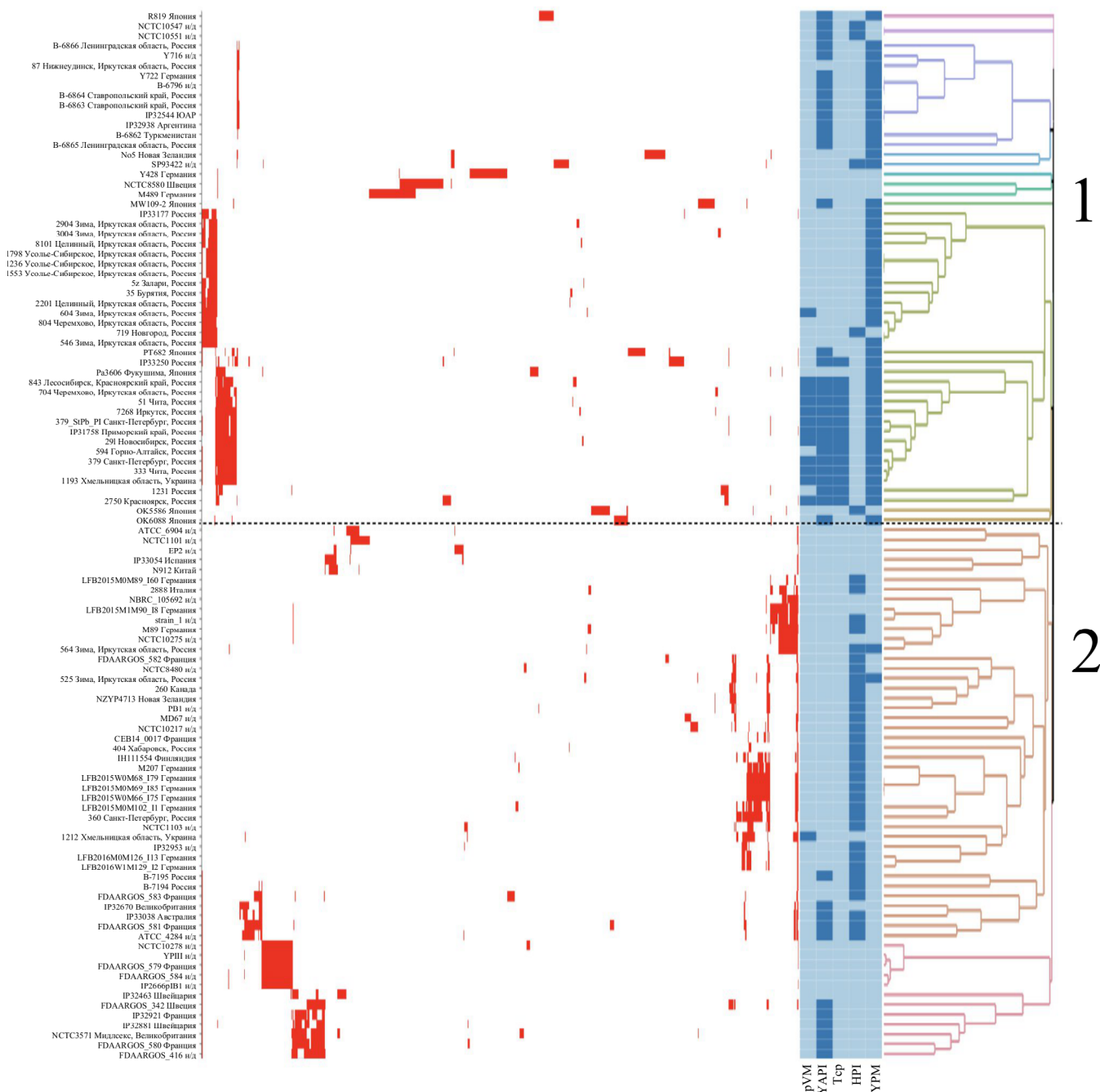


Рис. 2. Кластеризация штаммов *Y. pseudotuberculosis* ($n = 56$) по наличию спейсеров.

Данные секвенирования локусов CRISPR-Cas-систем ($n = 31$) и сиквенсов в NCBI ($n = 75$).
Условное обозначение по цветам: наличие спейсера — красный, наличие фактора патогенности — синий.

Fig. 2. Clusterization of *Y. pseudotuberculosis* strains ($n = 56$) by presence of spacer.

CRISPR-Cas system sequenced data ($n = 31$) and NCBI data ($n = 75$).
Color designations: presence of spacer — red, presence of factor — blue.

Швеции, Украине и Новой Зеландии. Для большинства штаммов данной группы (87%) характерно наличие гена суперантигена *urt*. Около половины штаммов (56%) несут «адгезивный остров патогенности» YAPI (в том числе ген *tcp*), при этом у части штаммов выявлена также плаزمида rVM82 (22%).

Группа 2 включает 54 штамма, выделенных преимущественно в странах Европы (51%), за исключени-

ем 7 (13%) штаммов из других стран (Китай, азиатская часть России, Канада, Новая Зеландия, Австралия). Для большинства штаммов данной группы (59%) характерно наличие «острова патогенности» HPI. Другим преобладающим фактором патогенности является «адгезивный остров патогенности» YAPI (20%).

Таким образом, штаммы *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующие на территории России и ряда других стран,

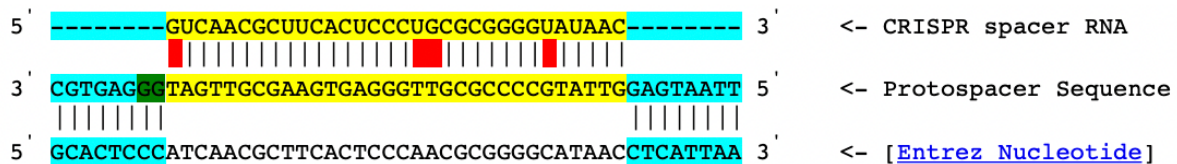


Рис. 3. Протоспейсерная последовательность плазмиды *Y. pseudotuberculosis* IP31758 pVM82 кДа (153 кб) к спейсеру 114 локуса YP3.

Fig. 3. Protospacer sequence of plasmid pVM82 kDa (153 kb) of *Y. pseudotuberculosis* IP31758 to spacer 114 of locus YP3.

нельзя чётко разделить на «азиатскую» и «европейскую» клады в зависимости от типа CRISPR-кластера, что связано с высокой вариабельностью штаммов. Вместе с тем проведённое сопоставление CRISPR-локусов с данными о наличии основных факторов патогенности позволило выявить генетические варианты штаммов *Y. pseudotuberculosis*, доминирующих на отдельных территориях. Можно заключить, что большинство штаммов, циркулирующих на территории России, отличается по данным молекулярным маркерам от штаммов из других стран.

Анализ протоспейсерных последовательностей в геномах фагов и плазмид

Исходя из иммунной функции CRISPR-Cas-системы, произведён поиск гомологичных последовательностей в геномах основных мобильных генетических элементов (МГЭ) — бактериофагах и плаزمид. Суммарно в CRISPR-системах обнаружено 404 уникальных спейсерных последовательности, которые встречаются в разных штаммах. Анализ протоспейсеров в геномах бактерий, бактериофагов и плазмид выявил только 101 (25%) соответствие спейсеров фрагментам геномов.

20 спейсерных последовательностей гомологичны фрагментам геномов бактериофагов *Yersinia* YeP3, *Yersinia* YeP2, *Yersinia* YeP1, *Yersinia* vB_YenM, *Yersinia* vB_YenS_P400 и *Klebsiella* 6991. Семьдесят спейсерных последовательностей гомологичны последовательностям хромосом разных видов *Yersinia*: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. similis*, *Y. massiliensis*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*. Согласно результатам анализа геномов с помощью онлайн-инструмента PHASTER, фрагменты геномов, содержащие протоспейсерные последовательности, соответствуют полноценным профагам [20, 24]. Один и тот же спейсер может быть гомологичен фрагментам генома профагов, обнаруженных в разных штаммах. Кроме того, спейсеры, представленные в одном локусе, способны узнавать разные фрагменты генома одного и того же профага.

Семь спейсеров гомологичны последовательностям генома плазмид *Y. pseudotuberculosis* и *Y. massiliensis*, 4 спейсера гомологичны последовательности крипточеской плазмиды pYptb32953 размером 27,7 kb, которая встречается достаточно редко в штаммах патогенных иерсиний. Основная функция данной плазмиды — участие в конъюгации: в геноме плазмиды расположен

кластер генов, кодирующих белки, необходимые для конъюгации плазмиды. Четыре спейсерных последовательности оказались гомологичны участку генома плазмиды pVM82 штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP31758 и *Y. pseudotuberculosis* 598 (номера доступов в NCBI RefSeq: NC_009705 и NZ_CP071946), за исключением 4 нуклеотидов (рис. 3). В геноме плазмид находятся гены фагоподобной интегразы, что может свидетельствовать о приобретении кластера генов *icm/dot* системы секреции IVB-типа через механизмы горизонтального переноса.

Обсуждение

Основная функция CRISPR-Cas-систем — это специфическое узнавание и уничтожение чужеродных генетических элементов, попавших в бактериальную клетку и представляющих потенциальную опасность для существования популяции бактерии [25, 26]. Следовательно, последовательности спейсеров будут гомологичны фрагментам геномов МГЭ, характерных для определённых территорий. Способность приобретать спейсеры в хронологическом порядке и высокая доля полиморфизмов позволяет использовать CRISPR-Cas-системы как инструмент высокоразрешающего молекулярного типирования штаммов, что было продемонстрировано на примере *Streptococcus thermophilus* [27], *Campylobacter jejuni* [26], *Corynebacterium diphtheriae* [28] и *Y. pestis* [29]. Известно, что CRISPR-локусы являются динамической структурой, где новые спейсерные последовательности присоединяются со стороны лидерной последовательности [30]. Часть спейсеров, расположенных в середине кассеты, может быть потеряна в результате делеции во время приобретения новых последовательностей МГЭ. Спейсеры, расположенные около последнего полиморфного повтора, как правило, сохраняются [31].

Так, типирование штаммов по наличию спейсеров, расположенных в конце локусов YP1 и YP3, позволяет условно разделить штаммы, различающиеся набором детерминант вирулентности, на два кластера: «европейский» и «азиатский». Из исследованных 56 штаммов 35 выделены на территориях Дальнего Востока, Восточной и Западной Сибири. При этом происходит разделение на две подгруппы в зависимости от присутствия плазмиды pVM82 (pVM82⁺ и pVM82⁻), детерминирующей аппарат секреции IVB-типа и, наряду с другими факторами патогенности, опосредующей развитие генерализованных

форм псевдотуберкулёза. Штаммы, выделенные в Японии и Корее, также способные вызывать комплекс проявлений системной инфекции, названной дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой, имеют схожий паттерн распределения CRISPR-кассет.

Согласно результатам анализа PERMANOVA, состав локусов YP1 и YP3 зависит от наличия у штаммов таких факторов патогенности, как плаزمида pVM82 и «адгезивный остров патогенности» YAPI. Полученные результаты согласуются с ранее описанными отличиями длины локуса YP3: штаммы, имеющие данные основные детерминанты патогенности и вызывающие дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку, отличаются более длинным локусом YP3 по сравнению со штаммами, у которых pVM82 и YAPI не обнаружены [11]. К.А. Koskela и соавт. показали, что некоторые сиквенс-типы штаммов коррелируют со спейсерным составом CRISPR-кассет [9]. Ранее проведённый Т. Seecharran и соавт. филогенетический анализ штаммов *Y. pseudotuberculosis* выявил высокую степень разнообразия CRISPR-локусов среди штаммов, выделенных на азиатском континенте [10]. Пангеномный анализ штаммов *Y. pseudotuberculosis* не показал значимых соответствий в паттернах CRISPR-кассет и уникального геномного профиля штаммов [10]. Наиболее выраженные различия кластеров наблюдаются в вариабельном геноме, гены которого часто теряются или приобретаются путём горизонтального переноса.

Высокая вариабельность штаммов внутри вида определяется способностью приобретать новые генетические элементы (геномные острова) путём горизонтального переноса генов с помощью плазмид, бактериофагов, интегронов и транспозонов [32]. CRISPR-Cas как система «иммунитета» бактерий против МГЭ может участвовать в формировании генотипа штаммов *Y. pseudotuberculosis*, определяющего клинические проявления псевдотуберкулёза.

Анализ протоспейсеров в геномах бактерий, бактериофагов и плазмид выявил соответствие спейсеров участку генома плазмиды pVM82 штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP31758 и *Y. pseudotuberculosis* 598. Возможно, приобретение данных спейсеров может быть причиной отсутствия плазмиды pVM82 в штаммах, относящихся к «европейскому» кластеру. Спейсер, способный узнавать участок плазмиды, обнаруживается в локусе YP3 штамма *Y. pseudotuberculosis* 2750 серотипа O:1b, содержащего плазмиду pVM82 и кластер генов *icm/dot*. Вероятно, большое количество мутаций в протоспейсерной последовательности препятствует CRISPR-интерференции или данная последовательность может присутствовать в непредставленном в базах данных геноме бактериофага. Кроме того, приобретение спейсеров к собственным последовательностям может служить триггером для возникновения новых мутаций и экспрессии нового фенотипа, проявляющегося в изменении вирулентных свойств микроорганизма [25]. Согласно другой гипотезе спейсеры, узнающие собственные последова-

тельности, являются механизмом селекции штаммов, не содержащих данный фактор [33]. Таким образом, CRISPR-Cas-система может являться одним из факторов, определяющих циркуляцию разнообразных штаммов на одной территории. В сочетании с классическими методами идентификации и типирования возбудителя псевдотуберкулёза анализ CRISPR-локусов может быть использован для филогенетических исследований, мониторинга циркуляции штаммов *Y. pseudotuberculosis* на территориях, эпидемиологического расследования групповых заболеваний.

Метод секвенирования ПЦР-фрагментов по Сэнгеру имеет ряд ограничений, в частности невозможность секвенирования фрагментов длиной более 1000 п.н. Развитие методов секвенирования и накопление данных о бактериальных геномах в будущем позволит провести анализ CRISPR-локусов штаммов, не вошедших в исследованную выборку, а также сравнить полученные результаты с данными других методов типирования (например, MLST-типирования) возбудителя псевдотуберкулёза.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования CRISPR-типирования при мониторинге штаммов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на отдельных территориях, и выявления возможной связи структурно-функциональных характеристик сайтов CRISPR-Cas-систем с клиническими проявлениями псевдотуберкулёза. Имеющиеся данные определяют перспективу использования CRISPR-локусов в качестве специфических молекулярных маркеров при изучении внутривидового разнообразия и эволюции *Y. pseudotuberculosis*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М. У истоков экологической микробиологии: история открытия и изучения сапронозов. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018;(1):55–62. Andryukov B.G., Somova L.M. Transformation of the sapronose representations at the new stage of integration of knowledge about them. *Health, Medical Ecology, Science*. 2018;(1):55–62. DOI: <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1194901> EDN: <https://www.elibrary.ru/yssomm>
2. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(11):5103–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003>
3. Климов В.Т., Чеснокова М.В. Молекулярно-генетический мониторинг *Yersinia pseudotuberculosis* на основе ПЦР-О-генотипирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2007;(4):14–7. Klimov V.T., Chesnokova M.V. Molecular genetic monitoring of *Yersinia pseudotuberculosis* using PCR O-genotyping. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2007;(4):14–7. EDN: <https://www.elibrary.ru/iccuuj>
4. Кокорина Г.И., Сайнес Т.В., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А. Особенности эпидемического процесса и лабораторной диагностики иерсиниозов в Российской Федерации в 2016–2018 гг. *Проблемы медицинской микологии*. 2022;24(2):86. Kokorina G.I., Saines T.V., Bogumil'chik E.A.,

- Voskresenskaya E.A. Features of the epidemic process and laboratory diagnosis of Yersinioses in the Russian Federation in 2016-2018. *Problems in Medical Mycology*. 2022;24(2):86. EDN: <https://www.elibrary.ru/qbgywj>
5. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Никитин А.Я. и др. Анализ эпидемиологической ситуации по псевдотуберкулезу и кишечному иерсиниозу в России и прогноз заболеваемости на среднесрочную перспективу. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2018;(9):59–64. Chesnokova M.V., Klimov V.T., Nikitin A.Ya., et al. Analysis of the epidemiological situation on pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis in Russia and forecast of the incidence rate in the medium-term perspective. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2018;(9):59–64. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-306-9-59-64> EDN: <https://www.elibrary.ru/vagnaj>
 6. Laukkanen-Ninios R., Didelot X., Jolley K.A., et al. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing: MLST of the *Y. pseudotuberculosis* complex. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(12): 3114–27. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x>
 7. Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А., Лебедева С.А., Трухачев А.И. Обзор методов генетической дифференциации штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. 2022;(1):54–63. Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., Lebedeva S.A., Trukhachev A.L. Review of the methods of genetic differentiation of pseudotuberculosis pathogen strains. *Bulletin of Perm University. Series Biology*. 2022;(1):54–63. DOI: <https://doi.org/10.17072/1994-9952-2022-1-54-63> EDN: <https://www.elibrary.ru/roxmqp>
 8. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:172. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>
 9. Koskela K.A., Mattinen L., Kalin-Mänttari L., et al. Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPR-based immunity in conjugation: *Y. pseudotuberculosis* complex CRISPR database. *Environ. Microbiol.* 2015;17(11):4306–21. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12816>
 10. Seecharran T., Kalin-Manttari L., Koskela K., et al. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Genom.* 2017;3(10):e000133. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000133>
 11. Перетолчина Н.П., Климов В.Т., Воскресенская Е.А. и др. Локусный состав CRISPR-Cas системы *Yersinia pseudotuberculosis* различных генетических вариантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020;19(2):31–9. Peretolchina N.P., Klimov V.T., Voskresenskaya E.A., et al. CRISPR-Cas loci of *Yersinia pseudotuberculosis* strains with different genetic determinants. *Epidemiology & Vaccinal Prevention*. 2020;19(2):31–9. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39> EDN: <https://www.elibrary.ru/zqepfb>
 12. Кокорина Г.И. Генотипы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их клинические и диагностическое значение: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.; 2012. Kokorina G.I. Genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their clinical and diagnostic significance: Diss. St. Petersburg; 2012.
 13. Galardini M., Biondi E.G., Bazzicalupo M., Mengoni A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol. Med.* 2011;6:11. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11>
 14. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., et al. Using SPAdes de novo assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2020;70(1):e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
 15. Biswas A., Staals R.H.J., Morales S.E., et al. CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics*. 2016;17:356. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2627-0>
 16. Zhang Q., Ye Y. Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):92. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1512-4>
 17. Couvin D., Bernheim A., Toffano-Nioche C., et al. CRISPRCas-Finder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W246–51. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
 18. McGinnis S., Madden T.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Issue suppl. 2):W20–5. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
 19. Biswas A., Gagnon J.N., Brouns S.J.J., et al. CRISPRTarget: Bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biol.* 2013;10(5):817–27. DOI: <https://doi.org/10.4161/rna.24046>
 20. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1):W16–21. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
 21. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2021.
 22. Oksanen J., Simpson G., Blanchet G., et al. *Vegan: Community Ecology Package*; 2022. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
 23. Gu Z., Eils R., Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2847–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
 24. Zhou Y., Liang Y., Lynch K.H., et al. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Suppl.): W347–52. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>
 25. Westra E.R., Buckling A., Fineran P.C. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014;12(5):317–26. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3241>
 26. Medina-Aparicio L., Dávila S., Rebollar-Flores J.E., et al. The CRISPR-Cas system in *Enterobacteriaceae*. *Pathog. Dis.* 2018;76(1). DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/fty002>
 27. Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.C., et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 2008;190(4):1401–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01415-07>
 28. Vergnaud G., Zhou D., Platonov M.E., et al. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA. In: Perry R.D., Fetherston J.D., eds. *The Genus Yersinia*. New York: Springer New York; 2007:327–38. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-72124-8_30
 29. Mokrousov I., Limeschenko E., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. *Biotechnol. J.* 2007;2(7):901–6. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.200700035>
 30. Yosef I., Goren M.G., Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(12):5569–76. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>
 31. Garrett S.C. Pruning and tending immune memories: spacer in the CRISPR array. *Front. Microbiol.* 2021;12:664299. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664299>
 32. Bertelli C., Tilley K.E., Brinkman F.S.L. Microbial genomic island discovery, visualization and analysis. *Brief. Bioinform.* 2019;20(5):1685–98. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bby042>
 33. Wimmer F., Beisel C.L. CRISPR–Cas systems and the paradox of self-targeting spacers. *Front. Microbiol.* 2020;10:3078. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03078>

Информация об авторах

Перетолчина Надежда Павловна[✉] — м.н.с. НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, Россия, nadine1lenz@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9426-5197>

Воскресенская Екатерина Александровна — к.б.н., в.н.с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>

Кокорина Галина Ивановна — к.м.н., с.н.с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>

Богумильчик Елена Александровна — н.с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>

Климов Валерий Тимофеевич — к.м.н., с.н.с. отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>

Трухачев Алексей Леонидович — к.м.н., в.н.с. лаб. микробиологии чумы и других иерсиниозов Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

Джиоев Юрий Павлович — к.б.н., в.н.с. НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Злобин Владимир Игоревич — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов отдела арбовирусов и экспериментального производства Института вирусологии им. Д.И. Ивановского НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Участие авторов. *Перетолчина Н.П.* — проведение исследований, подготовка и редактирование текста, проведение статистического анализа, визуализация; *Воскресенская Е.А.* — проведение исследований, подготовка и редактирование текста, ресурсное обеспечение исследования; *Кокорина Г.И.*, *Богумильчик Е.А.* — проведение исследований; *Климов В.Т.*, *Трухачев А.Л.* — ресурсное обеспечение исследования; *Джиоев Ю.П.* — разработка концепции, разработка методологии; *Злобин В.И.* — разработка концепции, утверждение окончательного варианта. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 02.02.2023;
принята к публикации 25.03.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Nadezhda P. Peretolchina[✉] — junior researcher, Research Institute of Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia, nadine1lenz@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9426-5197>

Ekaterina A. Voskresenskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>

Galina I. Kokorina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>

Elena A. Bogumilchik — researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>

Valery T. Klimov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Epidemiology department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>

Alexey L. Trukhachev — Cand. Sci. (Med), leading researcher, Yersinia laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

Yuri P. Dzhioev — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Research Institute of Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Vladimir I. Zlobin — D. Sci. (Med.), Academician of RAS, Professor, head researcher, Department of arboviruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Professor, Microbiology, virology, and immunology department, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Author contribution. *Peretolchina N.P.* — research, preparation and editing of the text, statistical analysis, visualization; *Voskresenskaya E.A.* — conducting research, preparing and editing the text, resource support for the study; *Kokorina G.I.*, *Bogumilchik E.A.* — researching; *Klimov V.T.*, *Trukhachev A.L.* — resource support for research; *Dzhioev Yu.P.* — concept development, methodology development; *Zlobin V.I.* — development of the concept, approval of the final version. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 02.02.2023;
accepted for publication 25.03.2023;
published 28.06.2023

Приложение

к статье Перетолчиной Н.П., Воскресенской Е.А., Кокориной Г.И., Богумильчик Е.А.,
Климова В.Т., Трухачева А.Л., Джиоева Ю.П., Злобина В.И. «Разнообразие CRISPR-локусов
штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их ассоциация с факторами патогенности возбудителя»
(Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023;100(3):166–178.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-374>)

Характеристика изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis* ($n = 56$)

Characteristics of the studied strains of *Y. pseudotuberculosis* ($n = 56$)

№ No.	Штамм Strain	Источник выделения Source	Место выделения Place of isolation	Год выделения Year of isolation	Серотип Serotype	Факторы патогенности Pathogenicity factors			
						pVM82	YPM	YAPI	HPI
1	541 (IP33178)	Крыса Rat	Ангарск, Россия Angarsk, Russia	1995	1a	–	–	–	+
2	1815	Мышь Mouse	Ашхабад, Туркменистан Ashgabat, Turkmenistan	1978	Н/д N/d	–	–	–	+
3	1817	Мышь Mouse	Ашхабад, Туркменистан Ashgabat, Turkmenistan	1978	Н/д N/d	–	–	+	+
4	1798	<i>Apodemus uralensis</i>	Белиджи, Россия Belidgi, Russia	1960	Н/д N/d	–	+	–	+
5	35	Человек Human	Бурятия, Россия Buryatia, Russia	2008	1b	–	+	–	–
6	2b	Человек Human	Бурятия, Россия Buryatia, Russia	2010	1b	+	+	+	–
7	14	Человек Human	Владивосток, Россия Vladivostok, Russia	1951	1b	+	+	+	–
8	594	Человек Human	Горно-Алтайск, Россия Gorno-Altaysk, Russia	1993	1b	–	+	+	–
9	3z	Человек Human	Залари, Россия Zalari, Russia	2012	1b	–	+	–	–
10	5z	Человек Human	Залари, Россия Zalari, Russia	2012	1b	–	+	–	–
11	2904	Человек Human	Зима, Россия Zima, Russia	2004	1b	–	+	–	–
12	604	Человек Human	Зима, Россия Zima, Russia	2000	1b	+	+	–	–
13	546	Человек Human	Зима, Россия Zima, Russia	2000	1b	–	+	–	–
14	30-04	Человек Human	Зима, Россия Zima, Russia	2004	1b	–	+	–	–
15	525	Человек Human	Зима, Россия Zima, Russia	1999	1a	–	+	–	+
16	564	Человек Human	Зима, Россия Zima, Russia	1999	1b	–	+	–	+
17	7268	Человек Human	Иркутск, Россия Irkutsk, Russia	2003	1b	+	+	+	–
18	1189	Человек Human	Киев, Украина Kiev, Ukraine	2005	3	–	–	–	+
19	2750	Человек Person	Красноярск, Россия Krasnoyarsk, Russia	1996	1b	+	+	+	–

№ No.	Штамм Strain	Источник выделения Source	Место выделения Place of isolation	Год выделения Year of isolation	Серотип Serotype	Факторы патогенности Pathogenicity factors			
						pVM82	YPM	YAPI	HPI
20	410	Человек Human	Красноярск, Россия Krasnoyarsk, Russia	2008	1b	+	+	+	-
21	843	Человек Human	Лесосибирск, Россия Lesosibirsk, Russia	1997	1b	+	+	+	-
22	1813	Человек Human	Минск, Беларусь Minsk, Belarus	1980	Н/д N/d	-	-	-	-
23	37п	Человек Human	Нижнеудинск, Россия Nizhneudinsk, Russia	2012	1b	-	+	-	-
24	87	Человек Human	Нижнеудинск, Россия Nizhneudinsk, Russia	2012	1b	-	+	-	-
25	719	Н/д N/d	Новгород, Россия Novgorod, Russia	Н/д N/d	1a	-	-	-	+
26	29I	Человек Human	Новосибирск, Россия Novosibirsk, Russia	2005	1b	+	+	+	-
27	702 (IP33126)	Н/д N/d	Петрозаводск, Россия Petrozavodsk, Russia	1983	1b	-	-	-	+
28	1186	Землеройка Shrew	Полтавская область, Украина Poltava region, Ukraine	2005	Н/д N/d	-	-	-	+
29	1187	Серая крыса Norway rat	Полтавская область, Украина Poltava region, Ukraine	2005	1	-	-	-	+
30	379	Человек Human	Санкт-Петербург, Россия St. Petersburg, Russia	2000	1b	+	+	+	-
31	1603	Человек Human	Санкт-Петербург, Россия St. Petersburg, Russia	2011	1	-	-	+	+
32	1797	Мышь Mouse	Санкт-Петербург, Россия St. Petersburg, Russia	1954	Н/д N/d	-	+	-	+
33	360	Грызун Rodent	Санкт-Петербург, Россия St. Petersburg, Russia	Н/д	1a	-	-	-	+
34	1375	Теленок Calf	Саратов, Россия Saratov, Russia	2002	3	-	+	+	-
35	1380	Теленок Calf	Саратов, Россия Saratov, Russia	2002	3	-	+	+	-
36	1806	<i>Erythrocebus patas</i>	Сухуми, Абхазия Sukhumi, Abkhazia	1971	1	-	-	-	+
37	1804	<i>Erythrocebus patas</i>	Сухуми, Абхазия Sukhumi, Abkhazia	1970	1	-	-	-	+
38	1810	Мышь Mouse	Улан-Батор, Монголия Ulaanbaatar, Mongolia	1978	Н/д N/d	-	+	-	-
39	1808	Человек Human	Улан-Батор, Монголия Ulaanbaatar, Mongolia	1978	4	-	+	-	-
40	12i-36	Человек Human	Усолье-Сибирское, Россия Usolie-Sibirskoe, Russia	2002	1b	-	+	-	-
41	15i-53	Человек Human	Усолье-Сибирское, Россия Usolie-Sibirskoe, Russia	2002	1b	-	+	-	-
42	392	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1969	1a	-	-	-	+

№ No.	Штамм Strain	Источник выделения Source	Место выделения Place of isolation	Год выделения Year of isolation	Серотип Serotype	Факторы патогенности Pathogenicity factors			
						pVM82	YPM	YAPI	HPI
43	396k	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1969	1a	–	–	–	+
44	402	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1968	1a	–	–	–	+
45	453	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1969	1a	–	–	–	+
46	398	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1968	1a	–	–	–	+
47	404	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1968	1a	–	–	–	+
48	399	Ласточка Martin	Хабаровск, Россия Khabarovsk, Russia	1968	1a	–	–	–	+
49	1193	Полевка обыкновенная Common vole	Хмельницкая область, Украина Khmelnitsky region, Ukraine	2005	Н/д N/d	+	+	+	–
50	1212	<i>Myodes glareolus</i>	Хмельницкая область, Украина Khmelnitsky region, Ukraine	2005	Н/д N/d	+	–	–	–
51	22-01	Человек Human	Целинный, Россия Tselinny, Russia	2001	1b	–	+	–	–
52	81-01	Человек Human	Целинный, Россия Tselinny, Russia	2001	1b	–	+	–	–
53	8-04	Человек Human	Черемхово, Россия Cheremkovo, Russia	2004	1b	–	+	–	–
54	7-04	Человек Human	Черемхово, Россия Cheremkovo, Russia	2004	1b	+	+	+	–
55	51	Человек Human	Чита, Россия Chita, Russia	1990	1b	+	+	+	–
56	333	Человек Human	Чита, Россия Chita, Russia	1990	1b	+	+	+	–

Примечание. Н/д — не дифференцировано.

Note. N/d — not differentiated.

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-381>



Патогенетическая роль цитокинов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике и при различной степени тяжести

Иванов М.Ф.^{1✉}, Балмасова И.П.²

¹Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия;

²Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Аннотация

Цель работы — определение взаимосвязи между уровнями цитокинов провоспалительного и противовоспалительного действия в динамике геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) и зарегистрированными ранее особенностями фенотипического состава лимфоцитов крови при заболевании разной степени тяжести.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 65 пациентов с серологически верифицированным диагнозом ГЛПС. Контрольная группа включала 15 условно здоровых людей. Уровень цитокинов (интерлейкинов (ИЛ), интерферонов (ИФН), фактора некроза опухоли (ФНО)) в крови пациентов с ГЛПС определяли методом иммуноферментного анализа по периодам заболевания. Фенотипический состав лимфоцитов крови изучали методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. В разные периоды заболевания отмечен количественно различный рост содержания в крови цитокинов, сопряжённых с цитотоксическими иммунными реакциями (ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО- α , ФНО- β), а также ИЛ-10 и ИЛ-6, корреляционно связанных между собой при тяжёлом течении, на фоне падения в крови уровней ИЛ-4 и ИЛ-1 β . При среднетяжёлом течении ГЛПС отмечены корреляции уровней ИЛ-12 и ИЛ-4 с NKG2D⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), участие ИЛ-12 во взаимосвязях практически со всеми остальными цитокинами, корреляционная связь CD8⁺-регуляторных Т-клеток (Трег) с уровнями ИЛ-6 и ФНО- α . При тяжёлом течении отмечено образование комплекса, в состав которого входят связанные между собой ИЛ-6 и ИЛ-10, образующие корреляции с числом NKG2D⁺-ЦТЛ, CD8⁺-Трег, подобных натуральным киллерам Т-лимфоцитов (НКТ).

Заключение. Патогенетически значимый механизм ГЛПС реализуется с преимущественным участием цитокинов клеточного иммунного ответа и ИЛ-6, корреляционно связанных с NKG2D⁺-ЦТЛ, CD8⁺-Трег, НКТ, способствующих в случае благоприятного исхода активному формированию пула CD8⁺-клеток памяти, предположительно нарушаемому при избыточной секреции ИЛ-10.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, иммунопатогенез, цитокиновый профиль, фенотипы лимфоцитов

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен межвузовским Этическим комитетом (протокол № 204 от 11.12.2019).

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

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

Для цитирования: Иванов М.Ф., Балмасова И.П. Патогенетическая роль цитокинов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике и при различной степени тяжести. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2023;100(3):176–185.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-381>

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

Pathogenetic role of cytokines in hemorrhagic fever with renal syndrome in dynamics and disease of various severity

Mikhail F. Ivanov¹✉, Irina P. Balmasova²

¹Samara State Medical University, Samara, Russia;

²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Abstract

The aim of the work is to determine the relationship between the levels of cytokines of proinflammatory and anti-inflammatory action during the clinical course of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and the previously described characteristics of the phenotypic composition of blood lymphocytes in disease of various severity.

Materials and methods. 65 patients with a serologically verified diagnosis of HFRS were under observation. The control group included 15 conditionally healthy people. Determination of cytokines in the blood of patients with HFRS was carried out by the enzyme immunoassay method at the different stages of the disease. The phenotypic composition of blood lymphocytes was assessed by flow cytometry.

Results. At the different stages of the disease, there was a quantitatively different increase in the content of cytokines in the blood associated with cytotoxic immune reactions (IL-12, IFN, TNF α , TNF β), as well as IL-10 and IL-6 correlated with each other in severe cases, against the background of a drop in blood levels of IL-4 and IL-1 β . In the moderate course of HFRS, correlations of IL-12 and IL-4 with NKG2D⁺ CTL, the relationship of IL-12 with almost all other cytokines, and the correlation of CD8⁺ Treg with IL-6 and TNF levels were observed. In severe cases, the formation of a complex that included interconnected IL-6 and IL-10 correlating with the number of NKG2D⁺ CTL, CD8⁺ Treg, NKT was noted.

Conclusion. The pathogenetically significant mechanism of HFRS is realized with the predominant participation of cytokines of the cellular immune response and IL-6, correlatively associated with NKG2D⁺ CTL, CD8⁺ Treg, NKT, which, in case of a favorable outcome, contribute to the active formation of a pool of CD8⁺ memory cells, disrupted presumably by excessive secretion of IL-10.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome, immunopathogenesis, cytokine profile, lymphocyte phenotypes

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Interuniversity Ethics Committee (protocol No. 204, December 11, 2019).

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

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

For citation: Ivanov M.F., Balmasova I.P. Pathogenetic role of cytokines in hemorrhagic fever with renal syndrome in dynamics and disease of various severity. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3): 176–185. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-381> EDN: <https://www.elibrary.ru/ouwctxb>

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — острое вирусное природно-очаговое заболевание, проявляющееся геморрагическим синдромом, гемодинамическими расстройствами и поражением почек с развитием острой почечной недостаточности. Возбудитель ГЛПС относится к семейству *Hantaviridae*, роду *Orthohantavirus*. В настоящее время известно более 80 серологически и генетически отличающихся друг от друга типов хантавирусов, из них около 25 обладают патогенностью для человека. В качестве характерных особенностей ГЛПС, придающих ей медико-социальное значение, отмечаются наличие стойких природных очагов с инфицированием животных

многих видов; возможность летального исхода; высокая частота длительно сохраняющихся резидуальных явлений; сложность ранней этиотропной диагностики; отсутствие тенденции к снижению заболеваемости, надежного этиотропного лечения и эффективных способов профилактики; попытки использовать возбудителей в качестве биологического оружия [1–4].

В течении ГЛПС клинически различают следующие периоды:

- инкубационный (в среднем 2–3 нед);
- лихорадочный (начальный, общетоксический от 3 до 7 дней);
- олигоурический, проявляющийся геморрагическим синдромом и острой почечной недо-

статочностью с резким снижением суточного количества мочи вплоть до анурии (в среднем 6–12 дней);

- полиурический со значительным нарастанием суточного количества мочи (в среднем 6–14 дней);
- период реконвалесценции (ранний — до 2 мес и поздний — до 2–3 лет) [5].

Поскольку ГЛПС проявляется системным воспалением, это заболевание сопровождается «цитокинным штормом». Такие цитокины, как интерферон (ИФН) - α , интерлейкины (ИЛ) -6, -1, определяют развитие лихорадки, инфекционно-токсического шока, продукцию белков острой фазы, а фактор некроза опухоли (ФНО) - α , ИФН- β , ИЛ-6 повышают проницаемость сосудов и нарушают функции эндотелиальных клеток. ФНО- α и ИФН- γ влияют на тяжесть течения инфекционного процесса. Диагностически значимым является высокий уровень ИЛ-10 на протяжении всего заболевания [6, 7].

В наших предыдущих работах были описаны уникальные феномены, связанные с особенностями изменения фенотипического состава лимфоцитов на разных этапах развития ГЛПС:

- высокие уровни численного содержания в крови регуляторных Т-клеток (Трег) $CD3^+CD4^+FoxP3^-$, особенно $CD3^+CD8^+FoxP3^-$ -фенотипов, регистрируемых уже в первые дни заболевания, что было интерпретировано нами как иммуносупрессорный механизм, контролирующий развитие «цитокинного шторма»;
- рост с начального периода ГЛПС числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, $CD3^+CD8^+$), экспрессирующих активирующий рецептор лектинового типа NKG2D;
- начиная с конца олигоурического периода — нарастание представительства в крови подобных натуральным киллерам Т-лимфоцитов (НКТ) с фенотипом $CD3^+CD56^+$ [8].

Описанные в литературе экспериментальные модели позволили охарактеризовать патогенетическое значение всех этих явлений следующим образом. NKG2D-рецептор ЦТЛ является костимулирующей молекулой специфического Т-клеточного рецептора и проявляет своё костимулирующее действие только в активированных клетках. Установлено, что после преобразования костимулирующего сигнала с участием рецепторов Т-клеток (TCR) и активационного маркера — лектинового рецептора С-типа NKG2D ЦТЛ приобретают способность к цитолизу NKG2D-зависимым, но не TCR-зависимым способом. Дело в том, что лигандами для NKG2D, в отличие от TCR, служат не презентируемые инфицированной клеткой чужеродные антигены, а собственные молекулы, экспрессируемые повреждёнными клетками и относящиеся к категории

МНС-I-подобных стресс-индуцированных молекул (MICA, MICB) и 4 категорий цитомегаловирус-индуцированных молекул (ULPB1-4) [9]. По мере развития этого механизма мишенями цитотоксического действия NKG2D⁺-ЦТЛ становятся не столько клетки, инфицированные возбудителем ГЛПС, сколько любые повреждённые клетки, что создаёт условия для частичного ускользания хантавируса от элиминации в ходе адаптивного иммунного ответа [10]. На других моделях показано, что это приводит к росту антигенной нагрузки на иммунную систему и увеличению представительства в крови $CD8^+$ -Трег [11], что наблюдалось и в наших исследованиях при ГЛПС [8].

NKG2D, экспрессируемые ЦТЛ, в присутствии ИЛ-15 играют ключевую роль в становлении пула $CD8^+$ -клеток памяти. Существованием этого механизма можно объяснить, в частности, тот факт, что ГЛПС — это всегда остро протекающая инфекция. В свою очередь, активация NKG2D⁺-клеток памяти приводит к трансформации этих клеток в цитокинпродуцирующие подобные натуральным клеткам-киллерам Т-клетки (НКТ), осуществляющие дальнейшую регуляцию иммунного процесса через цитокины, контролирующее соотношение различных субпопуляций Т-лимфоцитов [12]. Все описанные механизмы, базирующиеся на проведённых нами ранее исследованиях и требующие дальнейших научных изысканий в этом направлении, позволяют совершенно по-новому взглянуть на патогенез ГЛПС и наметить как новые способы лечения этого заболевания, так и инновационные подходы к стимуляции механизмов иммунологической памяти при разработке пока ещё ненадёжных способов вакцинопрофилактики этого тяжёлого заболевания.

В соответствии с этим **целью** данного исследования было определение взаимосвязи между уровнями цитокинов провоспалительного и противовоспалительного действия в динамике ГЛПС и зарегистрированными ранее особенностями фенотипического состава лимфоцитов крови при заболевании разной степени тяжести.

Материалы и методы

Работа выполнялась в г. Самаре, находящемся в Среднем Поволжье — территории, эндемичной по ГЛПС, вызываемой хантавирусами типа *Puumala*. Основным природным резервуаром вируса является грызун европейская рыжая полёвка. Исследование включало иммунологическое наблюдение 65 пациентов с серологически верифицированным (путём постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции с парными сыворотками) диагнозом ГЛПС, находящихся на стационарном лечении в клиниках Самарского государственного медицинского университета. Контрольная группа включала 15 ус-

ловно здоровых людей. В основной группе было 40 (62%) женщин, в группе контроля — 10 (67%), хотя в литературе гендерные различия среди больных ГЛПС не отмечены [14], средний возраст пациентов с ГЛПС составлял $41,9 \pm 12,5$ года, в контрольной группе — $38 \pm 13,1$ ($p = 0,104$). У 53 (81,5%) больных ГЛПС заболевание имело среднетяжёлое течение, у 12 (18,5%) — тяжёлое. Дизайн исследования утверждён межвузовским этическим комитетом (протокол № 204 от 11.12.2019). Все субъекты, находящиеся под клиническим наблюдением, в соответствии с принципами Хельсинкской декларации были предупреждены об участии в исследовании и подписали информированное добровольное согласие.

Уровень цитокинов в крови пациентов с ГЛПС определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в каждый из периодов заболевания. ИФА осуществлялся из проб сыворотки крови с использованием комплекта аппаратуры, включающего планшетный фотометр «OPSYS MR» (ридер) («Thermolabsystems»), планшетный вошер ПП2-428 («Иммедтех»), принтер «Epson», и соответствующих моноклональных антител (МКА; «Вектор Бест»). Устанавливали содержание в крови провоспалительных (ИЛ-1 β , -6, -12, ФНО- α , ФНО- β , ИФН- γ) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, -10).

Фенотипический состав лимфоцитов крови определяли методом проточной цитофлуориметрии с применением цитофлуориметра BD FACSCanto II («Becton Dickinson») и с помощью МКА («BD Biosciences») в соответствии с инструкцией по применению прибора и МКА. Использовали стандартизированный комплект МКА «BD Multitest 6-Color TBNK Reagent» («BD Biosciences»), включающий меченные PerCP-Cy5.5 anti-CD45 МКА, меченные FITC anti-CD3 МКА, меченные PE-Cy7 anti-CD4 МКА, меченные APC-Cy7 anti-CD8 МКА, меченные APC anti-CD19 МКА, меченные PE anti-CD16/anti-CD56 МКА. Содержание Трег, НКТ, лимфоцитов, экспрессирующих CD314 и FoxP3, определяли в отдельных пробах с применением МКА («IOTest», «Beckman Coulter»): меченные PE-Cy5 anti-CD3 МКА, меченные PE-Cy5 anti-CD56 МКА, меченные PE anti-CD314 МКА, меченные FITC anti-FoxP3 МКА с использованием пермеабилизирующих компонентов.

Статистическую обработку результатов проводили на основе пакета статистических программ «SPSS v. 23». Использовали методы непараметрической дискриптивной (определение медианы, минимума, максимума по каждому параметру) и сравнительной (по критерию Манна–Уитни) статистики, а также корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции Спирмена и его достоверности.

Результаты

Результаты определения цитокинового профиля больных ГЛПС с разной степенью тяжести заболевания включали сравнение этих данных с группой контроля. Из полученных данных следует, что цитокиновые профили больных ГЛПС значительно различались в соответствии со стадиями инфекционного процесса (таблица; рис. 1). Достоверные отклонения от контроля демонстрировали практически все цитокины, при этом общие тенденции изменения показателей по сравнению с контрольными значениями для среднетяжёлого и тяжёлого течения заболевания полностью совпадают, хотя и регистрируются количественные различия.

В лихорадочный период наблюдался рост содержания в крови цитокинов, сопряжённых с клеточными (цитотоксическими) иммунными реакциями: ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО- α , ФНО- β . Кроме того, наиболее значительно возрастал уровень ИЛ-10 — цитокина с иммуносупрессорными и противовоспалительными свойствами. Уровни остальных цитокинов, в том числе провоспалительного действия (ИЛ-1 β , ИЛ-6), достоверно снижались. При этом совсем не выявлялись различия между цитокиновыми профилями больных со среднетяжёлым и тяжёлым течением ГЛПС.

В олигоурический период отмечено примерно двукратное снижение уровня в крови ИЛ-10 при достоверном нарастании уровня ИЛ-6, особенно при тяжёлом течении ГЛПС.

В полиурический период опять значительно возрос уровень ИЛ-10, содержание ИЛ-6 в крови оставалось на прежнем высоком уровне, а у цитокинов, участвующих в развитии клеточных цитотоксических реакций (ИЛ-12, ФНО- α , ФНО- β), уровень содержания в крови при тяжёлом течении заболевания был достоверно выше, чем при среднетяжёлом течении.

Описанные тенденции изменения цитокинового профиля прослеживаются и в период реконвалесценции только с тем отличием, что достоверный характер различий между тяжёлым и среднетяжёлым течением ГЛПС на уровне цитокинового профиля выявлен только для ИЛ-10, уровень которого в первом случае был выше.

Соответствующие изменения в разные периоды ГЛПС разной степени тяжести со стороны клеток иммунной системы различных фенотипов были детально проанализированы нами ранее [8, 14]. В данном исследовании для интерпретации полученных данных между уровнями цитокинов и содержанием в крови больных ГЛПС лимфоцитов различных фенотипов, оценённым в процессе исследований, определяли корреляционные связи с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Результаты корреляционного анализа по на-

Показатели цитокинового профиля в динамике у больных ГЛПС разной степени тяжести, медиана [минимум; максимум]
 Indicators of the cytokine profile in patients with HFRS in the dynamics of varying severity, median [minimum; maximum]

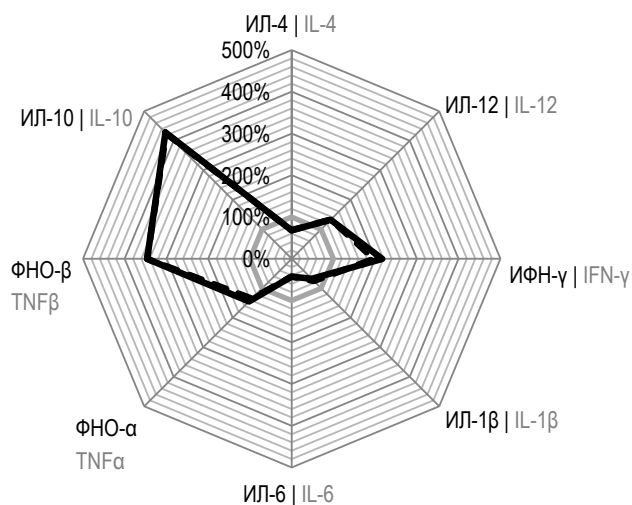
Цитокины, пг/мл Cytokines, pg/ml	Больные ГЛПС среднетяжёлого течения Patients with moderate HFRS	Больные ГЛПС тяжёлого течения Patients with severe HFRS	Здоровые люди (контроль) Healthy people (control)	p_1	p_2	p_3
Лихорадочный период ГЛПС HFRS feverish stage						
	$n = 7$	$n = 9$	$n = 15$			
ИЛ-4 IL-4	1,5 [1,5; 1,6]	1,5 [1,5; 1,6]	2,2 [1,3; 4,2]	0,999	0,011*	0,011*
ИЛ-12 IL-12	12,1 [11,7; 13,1]	12 [10,9; 12,1]	9,1 [7,8; 14,4]	0,513	< 0,001*	< 0,001*
ИФН- γ IFN γ	80,3 [72,2; 88,6]	88,6 [79,9; 94,8]	40,8 [27,5; 51,5]	0,376	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-1 β IL-1 β	2,86 [2,59; 3,04]	2,6 [2,4; 2,9]	3,8 [2,5; 5,2]	0,184	0,035*	0,042*
ИЛ-6 IL-6	26,4 [19,9; 26,8]	26,4 [20,0; 29,6]	6,2 [2,7; 9,2]	0,513	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- α TNF α	2,7 [2,55; 3,0]	2,9 [2,7; 3,0]	2,0 [0,8; 2,8]	0,513	0,258	0,198
ФНО- β TNF β	48,5 [38,1; 71,7]	48,5 [40,6; 51,1]	1,4 [0,6; 2,9]	0,487	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-10 IL-10	29 [24,9; 32,3]	29,6 [14,8; 32,3]	6,8 [3,4; 9,1]	0,827	< 0,001*	< 0,001*
Олигоурический период ГЛПС HFRS oliguric stage						
	$n = 12$	$n = 53$	$n = 15$			
ИЛ-4 IL-4	1,55 [1,5; 1,7]	1,6 [1,5; 1,8]	2,2 [1,3; 4,2]	0,834	0,010*	0,012*
ИЛ-12 IL-12	14,2 [12,3; 14,3]	12,3 [10,9; 13,7]	9,1 [7,8; 14,4]	0,049*	< 0,001*	< 0,001*
ИФН- γ IFN γ	86,5 [80,2; 88,6]	86,5 [80,3; 101]	40,8 [27,5; 51,5]	0,511	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-1 β IL-1 β	3,35 [3,22; 3,72]	2,49 [2,07; 3,19]	3,8 [2,5; 5,2]	0,004*	0,003*	< 0,001*
ИЛ-6 IL-6	35,1 [30,4; 39,4]	23,8 [17; 32,3]	6,2 [2,7; 9,2]	0,006*	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- α TNF α	2,94 [2,87; 3,33]	3,0 [2,74; 3,87]	2 [0,8; 2,8]	0,392	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- β TNF β	56,2 [51,0; 71,7]	52,3 [48,5; 82,1]	1,4 [0,6; 2,9]	0,556	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-10 IL-10	15,4 [13,9; 163]	14,3 [11,2; 100,5]	6,8 [3,4; 9,1]	0,432	< 0,001*	< 0,001*
Полиурический период ГЛПС HFRS polyuric stage						
	$n = 12$	$n = 53$	$n = 15$			
ИЛ-4 IL-4	1,6 [1,5; 1,7]	1,7 [1,6; 1,8]	2,2 [1,3; 4,2]	0,102	0,012*	0,015*
ИЛ-12 IL-12	16,6 [16; 17,8]	12,7 [11,7; 13,5]	9,1 [7,8; 14,4]	0,020*	< 0,001*	< 0,001*
ИФН- γ IFN γ	86,2 [81,7; 88,6]	88,6 [80,3; 90,6]	40,8 [27,5; 51,5]	0,193	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-1 β IL-1 β	2,68 [2,36; 2,94]	2,86 [2,620; 3,1]	3,8 [2,5; 5,2]	0,433	0,003*	< 0,001*
ИЛ-6 IL-6	28,6 [23,5; 31,7]	26,9 [17,7; 45,1]	6,2 [2,7; 9,2]	0,998	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- α TNF α	3,89 [3,43; 4,51]	3,22 [3,0; 3,47]	2,0 [0,8; 2,8]	0,039*	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- β TNF β	69,1 [59,1; 71,9]	54,3 [46,8; 60,1]	1,4 [0,6; 2,9]	0,020*	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-10 IL-10	31,8 [30,5; 35,1]	33,4 [12,6; 215,9]	6,8 [3,4; 9,1]	0,999	< 0,001*	< 0,001*
Период реконвалесценции ГЛПС HFRS convalescence stage						
	$n = 12$	$n = 53$	$n = 15$			
ИЛ-4 IL-4	1,6 [1,4; 1,6]	1,6 [1,6; 1,7]	2,2 [1,3; 4,2]	0,317	0,012*	0,012*
ИЛ-12 IL-12	13,3 [12,9; 14,9]	12,7 [11,7; 12,9]	9,1 [7,8; 14,4]	0,077	< 0,001*	< 0,001*
ИФН- γ IFN γ	90 [83,5; 130,1]	117,5 [109; 287]	40,8 [27,5; 51,5]	0,275	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-1 β IL-1 β	3,22 [2,99; 3,34]	2,8 [2,74; 2,98]	3,8 [2,5; 5,2]	0,053	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-6 IL-6	20,6 [16,2; 24,5]	23,8 [18,5; 21,9]	6,2 [2,7; 9,2]	0,513	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- α TNF α	3,6 [3,45; 3,78]	3,27 [3,0; 3,47]	2,0 [0,8; 2,8]	0,127	< 0,001*	< 0,001*
ФНО- β TNF β	53,2 [45,2; 60,1]	52,3 [48,5; 53,6]	1,4 [0,6; 2,9]	0,827	< 0,001*	< 0,001*
ИЛ-10 IL-10	17,5 [15,4; 18,3]	13 [9,3; 15,2]	6,8 [3,4; 9,1]	0,046*	< 0,001*	< 0,001*

Примечание. p_1 — вероятность различий в группах больных ГЛПС разной степени тяжести; p_2 — вероятность различий в группах больных среднетяжёлого течения ГЛПС и контроля; p_3 — вероятность различий в группах больных тяжёлого течения ГЛПС и контроля; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни.

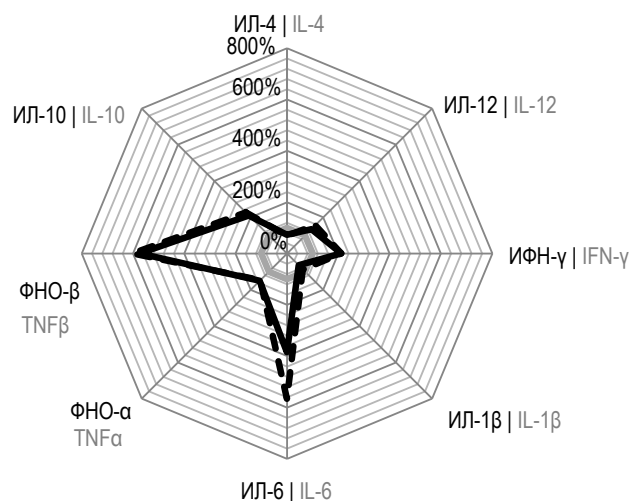
Note. p_1 — probability of differences in groups of patients with HFRS of various severity; p_2 — probability of differences in groups of patients with moderate course of HFRS and control; p_3 is the probability of differences in the groups of patients with severe HFRS and controls;

* $p < 0.05$ according to the Mann–Whitney test.

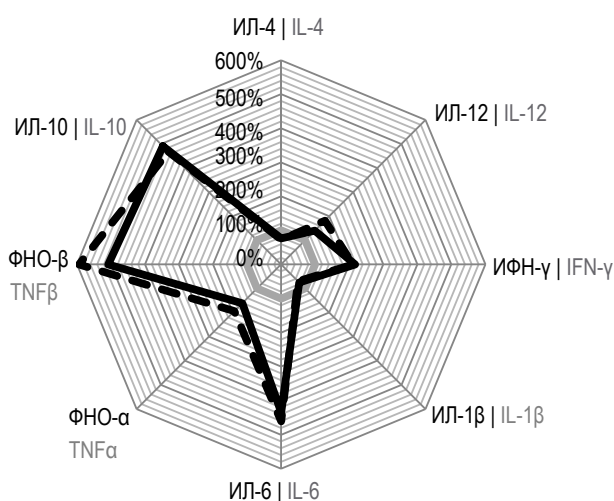
Лихорадочный период ГЛПС | HFRS feverish stage



Олигоурический период ГЛПС | HFRS oliguric stage



Полиурический период ГЛПС | HFRS polyuric stage



Период реконвалесценции ГЛПС | HFRS convalescence stage

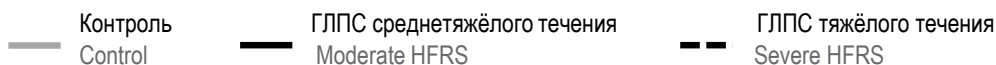
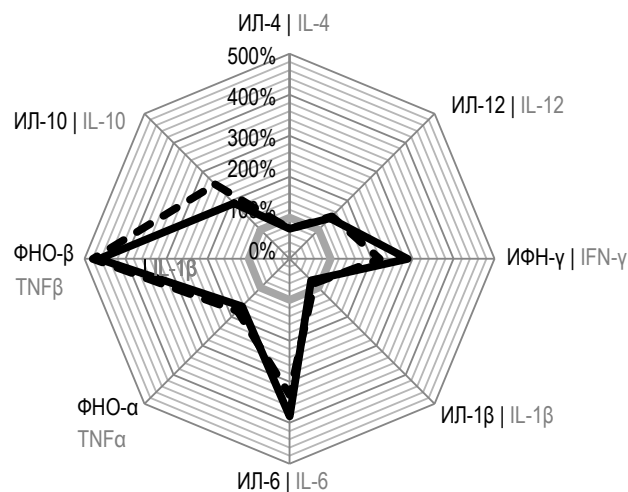


Рис. 1. Отклонение от контроля цитокинового профиля крови пациентов с ГЛПС разной тяжести течения.

Fig. 1. Deviation from the control of the cytokine profile of the blood of patients with HFRS of various severity.

личию достоверных ($p < 0,05$) корреляций показаны на **рис. 2**.

При среднетяжёлом течении заболевания практически все тестированные показатели (кроме содержания в крови $CD4^+$ -Трег) оказались в той или иной степени связанными между собой с некоторым преобладанием прямых корреляционных связей. Отрицательные корреляции при этом наблюдались только для уровня ИЛ-10, что соответствует его иммуносупрессорной активности.

Наиболее активными участниками корреляционных пар при среднетяжёлом течении ГЛПС со стороны цитокинов являются ИЛ-12, ФНО- α и - β , ИФН- γ , т.е. цитокины, отражающие участие в им-

мунном процессе лимфоцитов цитотоксического действия, а также ИЛ-10 с противовоспалительным эффектом. Со стороны клеток иммунной системы в парные корреляции широко вовлечены Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$), среди которых, судя по взаимосвязи с ИФН- γ , предположительно преобладают индуцирующие клеточные иммунные реакции Th1, ЦТЛ, особенно экспрессирующие NKG2D, НКТ и натуральные киллеры, а также клетки с выраженной иммуносупрессорной и противовоспалительной активностью — Трег как $CD4^+$, так и $CD8^+$ -фенотипов. Иными словами, как уже обсуждалось во введении, иммунный процесс имеет явную протективную направленность на элиминацию возбудите-

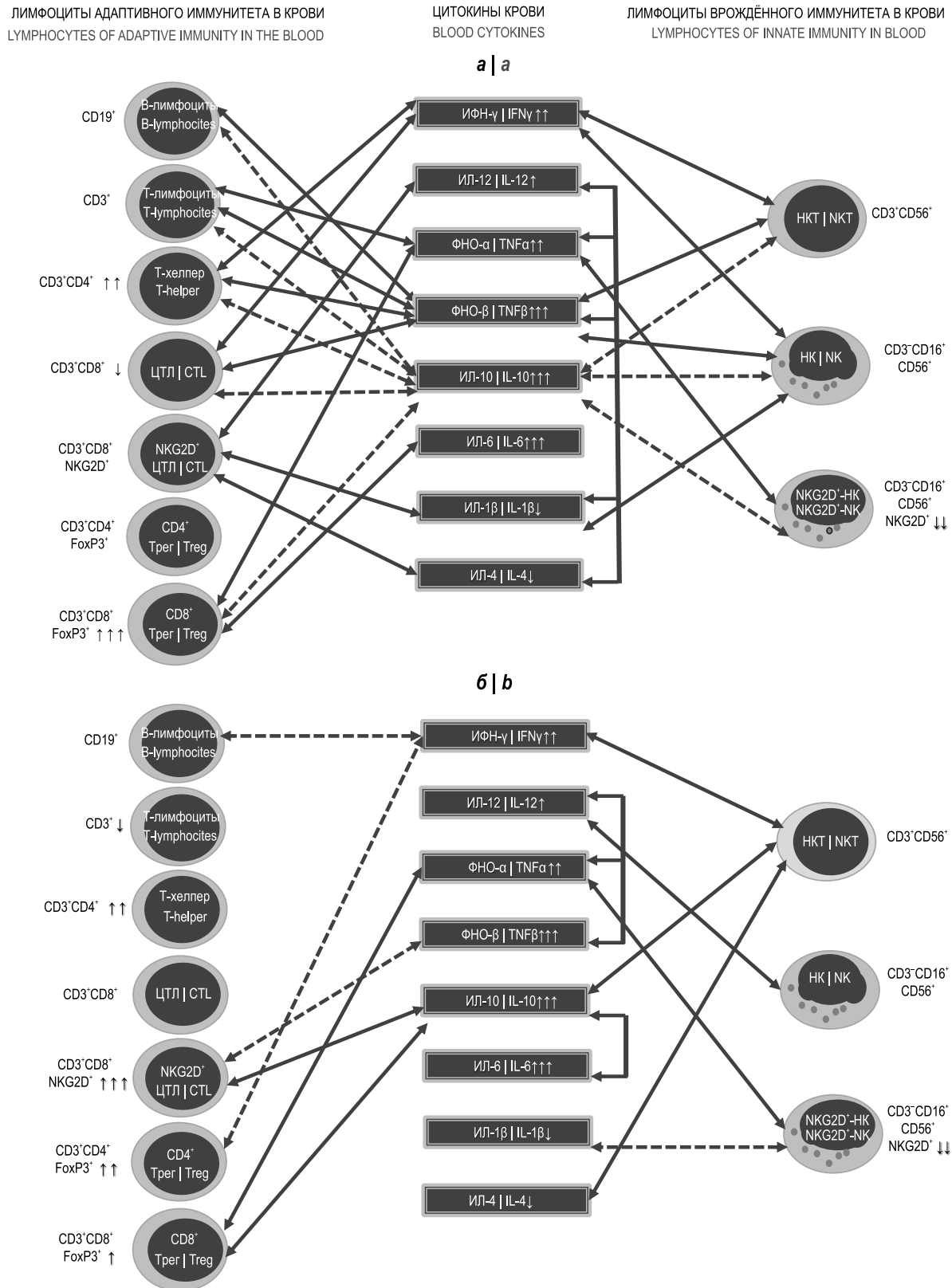


Рис. 2. Достоверные корреляционные связи между уровнями цитокинов и содержанием лимфоцитов различных фенотипов в крови при ГЛПС среднетяжёлого (а) и тяжёлого (б) течения.

Сплошные стрелки — положительные корреляции; пунктирные — отрицательные корреляции.

Fig. 2. Significant correlations between the levels of cytokines and the content of lymphocytes of various phenotypes in the blood in patients with moderate (a) and severe (b) HFRS.

Solid arrows — positive correlations; dotted lines — negative correlations.

ля из сосудистого русла и ограничение последствий «цитокинового шторма».

При тяжёлом течении ГЛПС число корреляционных пар резко уменьшалось — в 2,5 раза. При этом из состава корреляций выбыли некоторые основные популяции/субпопуляции лимфоцитов (Т-лимфоциты, Т-хелперы, ЦТЛ) при значительном уменьшении числа корреляционных связей для остальных клеток с преобладанием отрицательных корреляций и изменениями состава корреляционных пар.

С нашей точки зрения, особого внимания заслуживает преобладающее выраженное нарастание в крови корреляционно связанных между собой уровней ИЛ-6 и ИЛ-10 при участии ИЛ-10 в корреляционных связях с NKG2D⁺-ЦТЛ, НКТ и CD8⁺-Трег. При этом число НКТ, не отличаясь количественно от содержания в крови при среднетяжёлом течении, на фоне тяжёлого течения ГЛПС связано прямыми корреляционными связями не только с ИФН- γ , но и с ИЛ-10, а также ИЛ-4, т.е. с теми основными секреторными продуктами, что входят в спектр ключевых цитокинов НКТ с различными фенотипическими характеристиками.

Обсуждение

Особенностью данной работы является не столько характеристика цитокинового профиля крови у больных ГЛПС в динамике заболевания и в соответствии с его тяжестью течения, довольно хорошо изученная к настоящему времени, сколько исследование цитокинов провоспалительного и противовоспалительного действия как компонентов неизвестных ранее феноменов иммунопатогенеза ГЛПС. При этом особого обсуждения заслуживает значение изменений со стороны тестированных цитокинов в расшифровке механизмов участия в иммунопатогенезе ГЛПС NKG2D⁺-ЦТЛ, Трег, НКТ с учётом тяжести течения заболевания.

Как отмечено выше, NKG2D⁺-ЦТЛ при определённых цитокиновых воздействиях могут быть причастны к формированию пула CD8⁺-Т-лимфоцитов памяти, но насколько этот важный механизм может реализоваться при ГЛПС, сведений в научной литературе нет. В данном исследовании при анализе цитокинового профиля, характерного для среднетяжёлого течения данного заболевания, были зарегистрированы, в частности, корреляционные взаимосвязи между численным представителем в крови NKG2D⁺-ЦТЛ и уровнями ИЛ-4, ИЛ-12. В литературе имеются сведения о том, что экспрессия NKG2D у ЦТЛ находится под контролем ИЛ-4 и ИЛ-12, при этом ИЛ-4 подавляет экспрессию NKG2D, а ИЛ-12 её усиливает [15]. Если учесть, что в наших исследованиях уровень ИЛ-4 в крови при ГЛПС падает, а уровень ИЛ-12 — достоверно возрастает, а между ними и процентным содержанием

в крови в случаях среднетяжёлого течения заболевания существуют достоверные корреляционные связи, то есть основание предполагать, что при среднетяжёлом течении ГЛПС преобладают механизмы стимулирующих воздействий (с участием ИЛ-12) на экспрессию NKG2D ЦТЛ. При тяжёлом течении ГЛПС число NKG2D⁺-ЦТЛ ещё больше возрастает, но меняется характер взаимосвязи этого явления с цитокиновым профилем, при этом прямая корреляционная взаимосвязь установлена с уровнем только одного цитокина — ИЛ-10, который входит также в состав корреляционных пар с CD8⁺-Трег и НКТ.

Это лишний раз подтверждает высказанное нами ранее предположение о взаимосвязи тяжёлого течения ГЛПС с развитием в ходе инфекционного процесса уникального иммунопатогенетического механизма при ГЛПС, объединяющего функции клеток, показывающих наиболее высокий уровень в крови, — NKG2D⁺-ЦТЛ и CD8⁺-Трег с возможностью трансформации первых в НКТ. Это подтверждают и сведения, носящие разрозненный характер и полученные разными авторами на модели других патологических процессов, например, данные о способности ИФН- γ индуцировать Трег [16], ИЛ-6 и ФНО- α — активировать пролиферацию этих клеток [17], а ИЛ-6 — ещё и стимулировать продукцию ИЛ-10 на фоне нарушения миграционной способности этих клеток [18]. Все названные цитокины входят в единый комплекс корреляционных связей между цитокинами крови и лимфоцитами различных фенотипов, установленный нами при выполнении данных исследований.

Таким образом, в результате проведённых исследований появились реальные основания для формирования гипотезы о ряде иммунопатогенетических особенностей ГЛПС. Особую роль в данном инфекционном процессе, как и при других вирусных инфекциях, играют ЦТЛ, но при ГЛПС ключевое значение приобретает высокий уровень экспрессии этими клетками рецептора NKG2D, который на фоне инфекции, сопровождающейся тотальным функциональным повреждением клеток сосудистой стенки, выполняет функцию своеобразного мостика между реакциями адаптивного и врождённого иммунитета в пользу последнего. В регуляции этой функции, судя по результатам данного исследования, ведущую роль приобретает соотношение ИЛ-12 и ИЛ-4 при преобладании ИЛ-12. В литературе показано также, если такие NKG2D-индуцированные CD8⁺-Т-клетки памяти при определённых условиях подвергаются стимуляции цитокинами, то их активация может сопровождаться трансформацией этих клеток в НКТ, одновременно сочетающие цитокинпродуцирующие и цитотоксические свойства [12, 19], рост которых, судя по фенотипу CD3⁺CD56⁺, отмечен в полиурический период ГЛПС [8].

В механизмы действия этих клеток входит модуляция баланса регуляторные/эффektorные Т-клетки путём дифференцировки моноцитов в регуляторные макрофаги, которые, в свою очередь, могут индуцировать CD8⁺-Трег через значительный рост экспрессии ИЛ-10 [20], что подтверждается и нашими данными. Исследованный нами цитокиновый профиль не противоречит тому факту, что индукция Трег и продукция ими ИЛ-10 может поддерживаться ИЛ-6 и ФНО-α [18, 17], однако, судя по анализу корреляционных связей, избыточная экспрессия ИЛ-10 может привести к тяжёлому течению ГЛПС, что требует в дальнейшем более детального подтверждения.

Заключение

Патогенетически значимый механизм ГЛПС реализуется с преимущественным участием цитокинов клеточного иммунного ответа (ИЛ-12, ИФН-γ, ФНО-α и -β) и ИЛ-6, корреляционно связанных с NKG2D⁺-ЦТЛ, CD8⁺-Трег, НКТ, способствующих в случае благоприятного исхода инфекции активному формированию пула CD8⁺-Т-клеток памяти, предположительно нарушаемому при избыточной секреции ИЛ-10.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Иванова А.В., Попов Н.В., Куклев Е.В. и др. Обзор эпидемиологической обстановки по геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Российской Федерации за 1990–2015 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;94(2):16–21. Ivanova A.V., Popov N.V., Kuklev E.V., et al. Review of epidemiologic situation on hemorrhagic fever with renal syndrome (HERS) in Russian Federation in 1990–2015. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;94(2):16–21. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-2-16-21> EDN: <https://elibrary.ru/wtelru>
- Марцев А.А., Рудакова В.М., Ильина А.В. Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по природно-очаговым зоонозным инфекциям во Владимирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(5):20–6. Martsev A.A., Rudakova V.M., Il'ina A.V. Epidemic and epizootic situation of natural-focal zoonotic infections in Vladimir region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(5):20–6. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-20-26> EDN: <https://elibrary.ru/cambuy>
- Нехаев С.Г., Мельник Л.В. Актуальные аспекты геморрагической лихорадки с почечным синдромом (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2018;(1):151–8. Nekhaev S.G., Mel'nik L.V. Relevant pathogenesis aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome (literature review). *Journal of New Medical Technologies, eEdition*. 2018;(1):151–8. DOI: <https://doi.org/10.24411/2075-4094-2018-15980> EDN: <https://elibrary.ru/ypneon>
- Golden J.W., Hammerbeck C.D., Mucker E.M., et al. Animal models for the study of rodent-borne hemorrhagic fever viruses: arenaviruses and hantaviruses. *BioMed Res. Int*. 2015;2015:793257. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/793257>
- Avsic-Zupanc T., Saksida A., Korva M. Hantavirus infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;21S:e6–16. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- Мартыненко А.Ю., Томилка Г.С., Обухова Г.Г. Динамика цитокинов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2015;(4):47–50. Martynenko A.Yu., Tomilka G.S., Obukhova G.G. Cytokines dynamics in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Far East Medical Journal*. 2015;(4):47–50. EDN: <https://elibrary.ru/vbkyvh>
- Garanina E., Martynova E., Davidiyuk Y., et al. Cytokine storm combined with humoral immune response defect in fatal hemorrhagic fever with renal syndrome case, Tatarstan, Russia. *Viruses*. 2019;11(7):601. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11070601>
- Иванов М.Ф., Балмасова И.П., Жестков А.В. и др. Экспрессия NKG2D цитотоксическими Т-лимфоцитами как возможный механизм иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Иммунология*. 2023;44(1):93–102. Ivanov M.F., Balmasova I.P., Zhestkov A.V., et al. Expression of NKG2D by cytotoxic T lymphocytes as a possible mechanism of hemorrhagic fever with renal syndrome immunopathogenesis. *Immunology*. 2023;44(1):93–102. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2023-44-1-93-102>
- Verneris M.R., Karami M., Baker J., et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells. *Blood*. 2004;103(8):3065–72. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2125>
- Raulet D.H., Gasser S., Gowen B.G., et al. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31:413–41. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095951>
- Ligocki A.J., Niederkorn J.Y. Advances on non-CD4⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells: CD8⁺, type 1, and double negative T regulatory cells in organ transplantation. *Transplantation*. 2015;99(8):1553–9. DOI: <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000000813>
- Perez C., Prajapati K., Burke B., et al. NKG2D signaling certifies effector CD8 T cells for memory formation. *J. Immunother. Cancer*. 2019;7(1):48. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0531-2>
- Krautkrämer E., Grouls S., Urban E., et al. No gender-related differences in the severity of nephropathia epidemica, Germany. *BMC Infect. Dis.* 2013;13:457. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-457>
- Иванов М.Ф., Балмасова И.П., Жестков А.В. и др. Прогностическое значение фенотипических изменений лимфоцитов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. *Иммунология*. 2023;44(2):181–90. Ivanov M.F., Balmasova I.P., Zhestkov A.V., et al. Prognostic significance of phenotypic changes of lymphocytes in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Immunology*. 2023;44(2):181–90. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2023-44-2-181-190>
- Corradi G., Bassani B., Simonetti G., et al. Release of IFNγ by acute myeloid leukemia cells remodels bone marrow immune microenvironment by inducing regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* 2022;28(14):3141–55. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-3594>
- Kim Y.J., Han M.K., Broxmeyer H.E. 4-1BB regulates NKG2D costimulation in human cord blood CD8⁺ T cells. *Blood*. 2008;111(3):1378–86. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069450>
- Skartsis N., Peng Y., Ferreira L.M.R., et al. IL-6 and TNFα drive extensive proliferation of human Tregs without compromising their lineage stability or function. *Front. Immunol.* 2021;12:783282. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.783282>
- He S.W., Xue M.H., Cai G. IL-6 alters migration capacity of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in systemic lupus

- erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 2021;94(5):e13099.
DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.13099>
19. Prajapati K., Perez C., Rojas B.P., et al. Functions of NKG2D in CD8⁺ T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 2018;15(5):470–9.
DOI: <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.161>

Информация об авторах

Иванов Михаил Федорович[✉] — к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии СамГМУ, Самара, Россия, timerman_1972@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2528-0091>

Балмасова Ирина Петровна — д.м.н., проф., зав. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

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

Статья поступила в редакцию 13.03.2023;
принята к публикации 25.05.2023;
опубликована 28.06.2023

20. Liu Q., Zheng H., Chen X., et al. Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8⁽⁺⁾CD28⁽⁻⁾ regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* 2015;12(6):708–18.
DOI: <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.118>

Information about the authors

Mikhail F. Ivanov[✉] — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of general and clinical microbiology, immunology and allergology, Samara State Medical University, Samara, Russia, timerman_1972@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2528-0091>

Irina P. Balmasova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Pathogenesis and treatment methods of infectious diseases laboratory, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

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

The article was submitted 13.03.2023;
accepted for publication 25.05.2023;
published 28.06.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-304>



Способность к вегетированию и спорообразованию штаммов *Bacillus anthracis* с различными фенотипическими свойствами в условиях, имитирующих почву

Котенева Е.А.^{1,2✉}, Цыганкова О.И.¹, Калинин А.В.¹, Абрамович А.В.¹, Щербакова В.Ю.¹, Родионов И.С.¹

¹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

²Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. Изучение способности штаммов *Bacillus anthracis* с различающимися фенотипическими свойствами к герминации спор, размножению и спорообразованию на среде, основой которой является водный экстракт почвы, может способствовать оценке значимости этих процессов в формировании и поддержании почвенных очагов сибирской язвы.

Цель работы — анализ индивидуальных особенностей развития вегетативной культуры штаммов возбудителя сибирской язвы с различным фенотипом на модели почвенной среды.

Материалы и методы. На группе штаммов сибиреязвенного микроба, имеющих разный плазмидный состав и вирулентность, исследована возможность прорастания спор, размножения бацилл и, по крайней мере у некоторых из них, продуктивное спорообразование на почвенной среде.

Результаты. Выявлены три варианта развития культуры штаммов *B. anthracis*: 1 — споры остаются интактными, не прорастая; 2 — после герминации спор формируются бациллы, которые с различной интенсивностью размножаются, переходя в инволюционные формы без образования спор; 3 — прохождение полного физиологического цикла «спора–бацилла–спора». Наличие 2% крови в почвенной среде способствовало прорастанию спор и размножению культуры, но тормозило процесс спорообразования в период наблюдения — 3 сут. Не выявлено корреляции между определённым фенотипом изученных штаммов *B. anthracis* и способностью к прорастанию и вегетации на почвенных средах.

Обсуждение. Полученные данные о том, что только 1–7% КОЕ даёт начало формированию колоний на почвенной среде, позволяют предположить неоднородность свойств популяции использованных штаммов. Выделение таких культур и их дальнейшее подробное изучение позволит выявить наиболее значимые для осуществления полного физиологического цикла в условиях, имитирующих почву, комплексы биологических свойств.

Ключевые слова: сибирская язва, штаммы *Bacillus anthracis*, почвенная среда, фенотипические свойства, герминация спор, спорообразование

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

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

Для цитирования: Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю., Родионов И.С. Способность к вегетированию и спорообразованию штаммов *Bacillus anthracis* с различными фенотипическими свойствами в условиях, имитирующих почву. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):186–193.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-304>

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

Ability for vegetation and spore formation of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypical properties under soil simulating conditions

Elena A. Koteneva^{1,2}, Olga I. Tsygankova¹, Aleksander V. Kalinin¹,
Alena V. Abramovich¹, Victoriya Yu. Shcherbakova¹, Ivan S. Rodionov¹

¹Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia;

²North Caucasian Federal University, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. The study of the ability of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypic properties to spore germination, reproduction and sporulation on a medium based on an aqueous soil extract can help assess the significance of these processes in the formation and maintenance of soil anthrax foci.

Aim. The analysis of individual characteristics of the development of a vegetative culture of anthrax pathogen strains with different phenotypes in a soil medium model.

Materials and methods. On a group of anthrax microbe strains with different plasmid composition and virulence, the possibility of spore germination, reproduction of bacilli and, at least in some of them, productive spore formation on the soil medium was studied.

Results. Three variants of culture development of *B. anthracis* strains were identified: 1 — spores remain intact, not germinating; 2 — after germination of spores, bacilli are formed, which multiply with different intensity, passing into involutinal forms without spore formation; 3 — the passage of a complete physiological cycle "spore–bacillus–spore". The presence of 2% blood in the soil environment contributed to the germination of spores and reproduction of the culture, but inhibited the process of sporulation during the observation period of 3 days. No correlation was found between a certain phenotype of the studied strains of *B. anthracis* and the ability to germinate and vegetate on soil media.

Conclusion. The data obtained that only 1–7% of CFU gives rise to the formation of colonies on the soil medium suggest the heterogeneity of the properties of the population of the studied strains. Isolation of such cultures and their further detailed study will make it possible to identify the most significant complexes of biological properties for the realization of a complete physiological cycle under soil-simulating conditions.

Keywords: anthrax, *Bacillus anthracis* strains, soil environment, phenotypic properties, spore germination, spore formation

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

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

For citation: Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Abramovich A.V., Shcherbakova V.Yu., Rodionov I.S. Ability for vegetation and spore formation of *Bacillus anthracis* strains with different phenotypical properties under soil simulating conditions. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):186–193.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-304> EDN: <https://www.elibrary.ru/ovreep>

Введение

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — является патогенным для большого количества видов животных и человека и обладает комплексом приспособительных механизмов для активного размножения в организме млекопитающих и сохранению бацилл в почве. Непродолжительная фаза существования в организме чувствительных животных подчинена цели быстрого и продуктивного размножения бацилл. В отличие от людей, болеющих в основном локализованной кожной формой, у чувствительных к данной инфекции животных наблюдается генерализованная

форма заболевания, результатом которой является их гибель. В этом случае в предагональном периоде в биоматериале достигается очень высокая концентрация бацилл, прошедших отбор по признаку вирулентности. В естественных условиях (при отсутствии специальных мер человека) на протяжении длительного процесса эволюции сибирезвенного микроба бациллы вместе с трупом и биологическими жидкостями попадали в почву, где происходил процесс формирования спор, обеспечивающий при определённых почвенно-климатических условиях их длительное сохранение [1, 2]. Учитывая, что в процессе вынужденной прирезки больных живот-

ных на почву попадает значительный объём крови, которая является прекрасной питательной средой, обеспечивающей размножение бацилл даже в виде незначительной добавки к различным субстратам (почве), можно предположить, что такие участки почвы способны стать микроочагами размножения бацилл и при определённых условиях накапливать споры. Несмотря на то что общепризнанной основной функцией почвенной фазы существования *B. anthracis* является длительное сохранение микроба в виде спор, в научной литературе активно обсуждается вопрос и о возможности вегетирования сибиреязвенного микроба в почве, впервые поднятый в работе [3]. Подтверждением существования вегетативной фазы в почве может служить тот факт, что в определённых условиях *B. anthracis* может расти *in vitro* в виде биоплёнки [4], которая является предпочтительным состоянием для микроорганизмов в окружающей среде. Е. Saile и соавт. показали, что в модели системы ризосферы *B. anthracis* растёт как сапрофит [6]. В свете этих данных необходимо отметить, что сибиреязвенный микроб находится в близком генетическом родстве с группой очень успешных почвенных микроорганизмов — *B. cereus sensu lato* [6]. С учётом длительности «почвенной» фазы существования *B. anthracis* и ее важности в формировании резервуара инфекции очевидна необходимость изучения всех факторов и процессов, оказывающих воздействие на микроба в этой сложной и многофакторной экологической системе.

Цель работы — анализ индивидуальных особенностей развития вегетативной культуры штаммов возбудителя сибирской язвы с различным фенотипом на модели почвенной среды.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *B. anthracis*: диплоидные 1(CO), 12/16, 14/41, 12/16-1 4P, 228, 228 прот (с классическим капсулообразованием), 1(CO)-S, 1(CO)-5-1 SM, 14/41-1a SM и 12/16-S (формирующую капсулу в атмосфере воздуха); а также акапсульные моноплазмидные 228/8, 14/41 Trp⁺ (pXO1⁺, pXO2⁻) и бесплазмидный 228/4. Среди исследованных штаммов были различающиеся по токсино- и капсулообразованию, протеолитической, гемолитической и лецитиназной активности, а также по принадлежности к основным генетическим группам А и В (таблица). Перечисленные свойства были изучены в соответствии с данными [3]. Штаммы *B. anthracis* были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора. Вся работа с культурами штаммов *B. anthracis* проводилась с соблюдением требований СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»). Споры для проведения эксперимента

получали в соответствии с МУК 4.2.2413–08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» на агаре Гладстона. После смыывания спор со среды дистиллированной водой (ДВ) и отстаивания взвеси в холодильнике в течение 3–4 сут жидкость удаляли, а из осадка спор делали мазки и окрашивали методом Ребигера для контроля наличия бактериального дебриса и единичных вегетативных клеток. Для очистки спор от указанных примесей применяли процедуру последовательной отмывки спор в ДВ с промежуточным контролем в окрашенных мазках из осадка. Убедившись, что взвесь спор не содержит вегетативной культуры и дебриса, из неё готовили взвесь 1×10^3 КОЕ/мл, которую использовали для засева питательных сред.

Основой почвенной среды служил водный экстракт почвы, который получали, заливая пробу почвы стерильной ДВ в соотношении 1 : 1 (по объёму). После тщательного перемешивания отстаивали для осаждения грубых частиц, измеряли рН (7,2) надосадочной жидкости, добавляли агар до концентрации 1,5%, стерилизовали и разливали в чашки Петри. В часть приготовленной почвенной среды после охлаждения до 45°C добавляли 2% крови человека, после чего разливали в чашки Петри.

Посев спор производили в дозе 1×10^2 КОЕ в объёме 100 мкл, распределяли шпателем по поверхности среды и инкубировали в термостате в атмосфере воздуха при 37°C. Результаты оценивали визуально по наличию роста и просмотром мазков, окрашенных методом Ребигера. В качестве контроля использовали аналогичные посевы на LB-агар, ВН-агар и почвенный агар с добавлением 2% гепаринизированной крови.

Результаты

Уже через 24 ч на всех контрольных средах наблюдался рост, соответствующий посевной дозе. В окрашенных мазках из культур с LB-агара и ВН-агара наблюдались типичные для *B. anthracis* интенсивно окрашенные бациллы, расположенные цепочками, многие из которых содержали внутриклеточно формирующиеся споры (рис. 1, а, б). В мазках культур с почвенно-кровяного агара наблюдалась типичная морфология бацилл в виде цепочек (рис. 1, в).

Они не формировали споры за исключением штаммов *B. anthracis* 228/8 (рис. 2, а) и 14/41 (рис. 2, б), у которых очень небольшое количество клеток начинали формировать споры. Кроме того, на почвенно-кровяной среде выделялся штамм 1(CO)-S с атипичным капсулообразованием, бациллы которого в этих условиях формировали капсулу (рис. 2, в), которая выявлялась и через 3 сут после посева (рис. 2, г).

В посевах на почвенной среде штаммы *B. anthracis* различались по способности спор про-

Фенотипические и генетические характеристики штаммов *B. anthracis*, использованных в работе
Phenotypic and genetic characteristics of *B. anthracis* strains used in the study

Наименование штаммов <i>B. anthracis</i> и их субкультур Name of <i>B. anthracis</i> strains and their subcultures	Источник выделения Selection source	Признак выделения Feature of selection	Фенотип Phenotype	Генетическая группа Genetic group	Плазмидный состав Plasmid composition	Категория вирулентности <i>in vitro</i> [12] Virulence category <i>in vitro</i> [12]
1CO	Кровь КРС Blood of cattle	Принадлежность к <i>B. anthracis</i> Belonging to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺	A	pXO1 ⁺ pXO2 ⁺	Высоковирулентные Highly virulent
228 прот	Штамм 228 Strain 228	Независимость от Trp Independence from Trp				
12/16-1 4P	Штамм 12/16-1 Strain 12/16-1	После 4 пассажей** After 4 passages**				
228	Производственный штамм Manufacturing strain	Принадлежность к <i>B. anthracis</i> Belonging to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	B		Умеренно вирулентные Moderately virulent
12/16	Отделяемое язвы Ulcer discharge					
14/41	Отделяемое язвы Ulcer discharge					
1CO-S	Штамм 1CO Strain 1CO	Cap ⁺ (O ₂)	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁺ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			Слабовирулентные Weakly virulent
12/16-S	Штамм 12/16 Strain 12/16					
1 CO-5-1 SM	Штамм 1CO-S Strain 1CO-S					
14/41-1a SM	Штамм 14/41-1 Strain 14/41-1					
228/8	Штамм 228 Strain 228	Вакцинный штамм Vaccine strain	Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺		pXO1 ⁺ pXO2 ⁻	Авирулентные Avirulent
14/41 Trp ⁺	Штамм 14-41 Strain 14-41	Независимость от Trp Independence from Trp	Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁺ Trp ⁺			
228/4	Штамм 228 Strain 228	Отсутствие капсулообразования Absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	B	pXO1 ⁻ pXO2 ⁻	Апатогенные Apathogenic

Примечание. ⁺Наличие признака; ⁻отсутствие признака; *признак не определен в связи с отсутствием роста. Cap(CO₂) — способность к образованию капсулы в атмосфере с 5% CO₂; Cap(O₂) — способность к образованию капсулы в атмосфере воздуха. Hly — способность лизировать отмытые эритроциты барана. Lec — фосфолипазная активность на плотной среде с яичным желтком. Trp — прототрофность по триптофану. Tox — формирование линий иммунопреципитации с противосибиреязвенным гамма-глобулином на среде СОПЭК.

**Данный штамм был выделен из популяции акапсульного штамма 12/16-1 путём последовательных 4 пассажей на беспородных белых мышах (при заражении культурой, полученной на предыдущем пассаже) и отличался от исходного по фенотипу, плазмидному составу и генотипу.

Note. ⁺Presence of a trait; ⁻absence of a trait; *trait not defined due to lack of growth. Cap(CO₂) — ability to form a capsule in an atmosphere with 5% carbon dioxide; Cap(O₂) — the ability to form a capsule in an air atmosphere. Hly — ability to lyse washed sheep erythrocytes. Lec — phospholipase activity on solid medium with egg yolk. Trp — tryptophan prototrophy. Tox — formation of immunoprecipitation lines with anti-anthrax gammaglobulin on SOPEK medium.

**This strain was isolated from the population of the capsular strain 12/16-1 by 4 consecutive passages on outbred white mice (when infected with the culture obtained at the previous passage) and differed from the initial one in phenotype, plasmid composition and genotype.

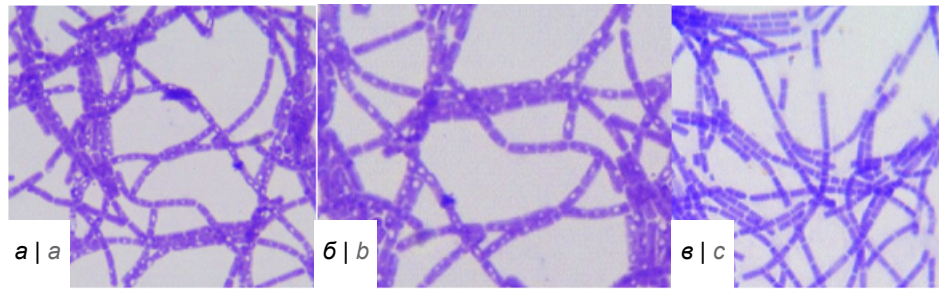


Рис. 1. Микрофотография окрашенных мазков суточной культуры штамма *B. anthracis* 1(CO) с LB-агара (а), ВН-агара (б) и почвенно-кровяного агара (в).

Окраска методом Ребигера, ×500.

Fig. 1. Micrograph of stained smears of daily culture of *B. anthracis* 1(CO) strain from LB-agar (a), BH-agar (b), and soil-blood agar (c).

Rebiger staining, ×500.

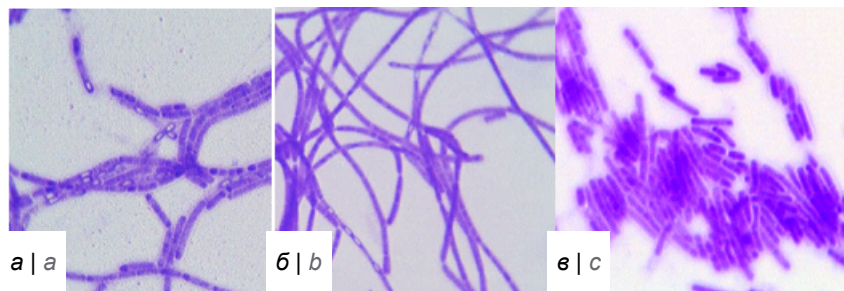


Рис. 2. Микрофотография окрашенных мазков суточной культуры штаммов *B. anthracis* 228/8 (а), 14/41 (б) и 1(CO)-S (в) и 3-суточной (г) с почвенно-кровяного агара.

Окраска методом Ребигера, ×500.

Fig. 2. Micrograph of stained smears of a daily culture of *B. anthracis* strains 228/8 (a), 14/41 (b), and 1(CO)-S (c) and a 3-day-old (d) from soil-blood agar.

Rebiger staining, ×500.

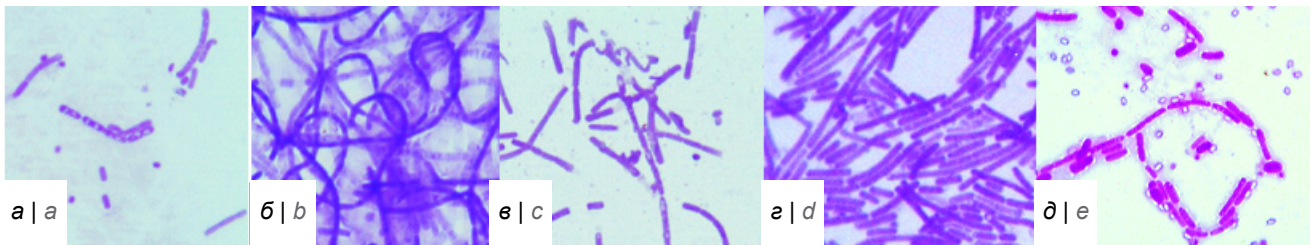


Рис. 3. Микрофотография окрашенных мазков 3-суточных культур штамма *B. anthracis* 1(CO) с почвенного агара (а) и почвенно-кровяного агара (б), штамма *B. anthracis* 228/4 с почвенного агара (в) и с почвенно-кровяного агара (г), штамма *B. anthracis* 228/8 с почвенно-кровяного агара (д).

Окраска методом Ребигера, ×500.

Fig. 3. Micrograph of stained smears of 3-day cultures of *B. anthracis* 1(CO) strain from soil agar (a) and soil-blood agar (b) and strain 228/4 from soil agar (c) and soil-blood agar (d), 228/8 from soil-blood agar.

Rebiger staining, ×500.

растать и формировать колонии на этой среде, а также образовывать споры. В первую очередь следует отметить, что по сравнению с контрольными средами рост на почвенной среде был очень скудным, штаммы формировали не более 1–7 колоний. Через 24 ч рост наблюдался только у штамма 1(CO), через 48 ч — у штаммов 1(CO)-5-1 SM, 228/4 и 228/8, а через 72 ч добавился рост штаммов 14/41, 14/41 Trp⁺, 1(CO)-S и 228. Штамм 12/16 и его произво-

дные 12/16-S и 12/16 1 4P, а также штаммы 14/41-1a SM и 228 прот не дали видимого роста в течение всего срока наблюдения (6 сут).

В окрашенных мазках 3-суточной культуры штамма *B. anthracis* 1(CO) (рис. 3, а), первым сформировавшего колонии на почвенном агаре, наблюдалось не только активное формирование внутриклеточных спор, но и значительное количество расположенных внеклеточно, часть

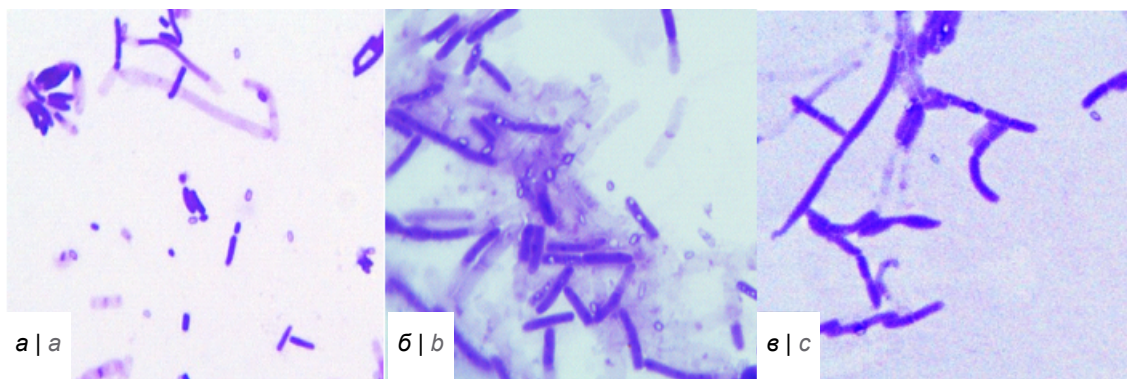


Рис. 4. Микрофотография мазка культуры штаммов *B. anthracis* 1(CO) (а), 14/41 (б) и 228/4 (в) с почвенной среды (6 сут).

Окраска методом Ребигера, $\times 500$.

Fig. 4. Micrograph of a culture smear of *B. anthracis* strains 1(CO) (a), 14/41 (b) and 228/4 (c) from the soil medium (6 days).

Rebigier staining, $\times 500$.

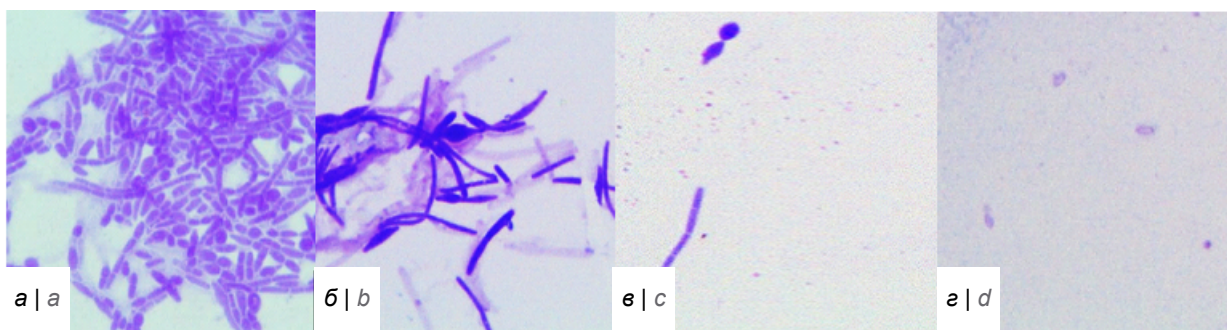


Рис. 5. Микрофотография мазка культуры штаммов *B. anthracis* 228 (а), 1(CO)-S (б), 228 прот (в) и 14/41-1а SM (г) с почвенной среды (6 сут).

Окраска методом Ребигера, $\times 500$.

Fig. 5. Micrograph of a culture smear of *B. anthracis* strains 228 (a), 1(CO)-S (b), 228 prot (c) and 14/41-1a SM (d) from the soil medium (6 days).

Rebigier staining, $\times 500$.

из которых интенсивно прокрашены, возможно, вследствие начала герминации. В этот же срок на почвенно-кровяной среде образование спор не отмечалось, несмотря на то что значительная часть бацилл находилась в стадии лизиса (деградации) (рис. 3, б). Похожая картина наблюдалась и в мазках штамма 228/4 (рис. 3, в, г). Исключение составил штамм 228/8, в мазках из 3-суточной культуры которого наблюдалось большое количество свободных спор (рис. 3, д).

По состоянию культуры на момент завершения эксперимента (6 сут) исследуемые штаммы *B. anthracis* можно разделить на несколько групп. Первую группу составляли штаммы *B. anthracis* 1(CO), 14/41 и 228/4 (рис. 4), в мазках у которых в эти сроки наблюдалось значительное количество вегетативной культуры, вероятно в различных физиологических фазах — интенсивно прокрашенные, с чёткими контурами бациллы и бледные «раздутые», нечётко контурированные клетки в виде теней. Встречались бациллы с изменённой формой (булавовидные и бочкообразные), увеличенные в

размерах. В значительном количестве встречались расположенные внеклеточно споры.

Культура штаммов *B. anthracis* 228, 1(CO)-S была представлена в основном изменёнными по форме и величине бациллами при отсутствии спор (рис. 5, а, б). При смыве минимальным количеством ДВ (0,05 мл) с поверхности почвенного агара после 6 сут инкубации штаммов *B. anthracis* 12/6 и 228 прот (рис. 5, в), которые не формировали видимых колоний, в мазках выявляли единичные бациллы, в том числе с изменённой морфологией. В мазке из смыва с почвенного агара, засеянного спорами штамма *B. anthracis* 14/41-1а SM, были обнаружены в небольшом количестве только неизменённые споры при полном отсутствии вегетативной формы (рис. 5, г), что свидетельствует об отсутствии условий для их прорастания.

Обсуждение

В результате проведённых экспериментов была выявлена способность спор большинства использованных штаммов *B. anthracis* проходить

стадию герминации с последующим формированием вегетативной культуры, а у части культур и последующее образование спор на питательной среде, основой которой является экстракт почвы. Добавление в такую агаризованную среду 2% гепаринизированной крови обеспечивало прорастание спор и формирование колоний у всех изученных в данной работе штаммов после инкубации в течение 1 сут. Влияние наличия крови в почвенной среде на эффективное спорообразование, очевидно, неодинаково у различных штаммов сибиреязвенного микроба. Так, после суточной инкубации на почвенно-кровоном агаре единичные бациллы в стадии спорообразования наблюдались в мазках только двух из исследованных штаммов — 228/8 и 14/41, а значительное количество внеклеточно расположенных спор наблюдалось только у штамма *B. anthracis* 228/8 через 3 сут. Отсутствие спорообразования на почвенно-кровоной среде в течение 3 сут у большинства использованных в работе штаммов *B. anthracis* подтверждает ингибирующее влияние крови на процесс образования спор [7]. Следует отметить, что в дальнейшем разложение белков крови почвенными бактериями, изменение влажности и температурного режима могут создать более благоприятные условия для спорообразования у большего количества штаммов.

Инкубирование посевов спор на почвенном агаре выявило возможность прохождения полного физиологического цикла развития культуры *B. anthracis* (спора–вегетативные клетки–споры) со значительным накоплением бактериальной массы, а затем и спор, пригодных для дальнейшего длительного сохранения или вступления в следующий физиологический цикл. Такие штаммы, вероятно, способны поддерживать эпизоотологическую значимость почвенных очагов сибирской язвы при определённых почвенно-климатических условиях. Споры большинства использованных в работе штаммов прорастали, образуя вегетативную культуру с различной степенью интенсивности размножения (от образования визуально различных колоний до прорастания спор с образованием одиночных-парных бацилл без интенсивного размножения). Через 6 сут в окрашенных мазках из колоний и смывах с поверхности среды таких штаммов вне зависимости от количества вегетативной культуры, только в некоторых из них встречались единичные во всём препарате споры (от 1 до 5) или вовсе отсутствовали, несмотря на то что культуры уже находились в стадии деградации в виде инволюционных форм — шарообразные и веретенообразные бациллы и их раздутые бледные тени. Такие штаммы вряд ли способны воспроизводить и тем более наращивать потенциал очага. Споры некоторых штаммов не способны прорасти в условиях данного опыта.

Анализ фенотипических свойств штаммов из различных групп по способности размножаться и формировать споры на почвенном агаре не позволил на данном этапе выявить корреляцию между этими параметрами. Так, штаммы *B. anthracis* 1(CO), 14/41 и 228/4, которые не только демонстрировали рост в виде колоний, но и формировали зрелые споры, т.е. теоретически были наиболее перспективными для поддержания «почвенной популяции», различались по принадлежности к основным генетическим группам А или В, плазмидному составу, токсино- и капсулообразованию, протеолитической активности и наличию дополнительных питательных потребностей в триптофане (таблица). Следует, однако, учитывать, что указанные в таблице свойства характеризуют использованные штаммы в целом. В то же время при посевной дозе 1×10^2 КОЕ штаммы *B. anthracis* 1(CO), 1(CO) S, 1(CO)-5-1 SM, 228, 228/4, 228/8, 14/41, 14/41 Grp⁺ формировали 1–7 колоний, что свидетельствует о возможности неоднородности популяции изученных штаммов и делает возможным присутствие отдельных клеток с фенотипом, отличающимся от подавляющего большинства популяции каждого штамма. Исходя из этого важным для оценки значения вегетирования сибиреязвенных бацилл в условиях, приближенных к почве, является характеристика свойств культур, непосредственно способных к росту на почвенной среде. Всё это делает актуальным выделение таких культур и изучение их фенотипических свойств, генетических характеристик и особенностей экспрессии различных генов.

Актуальным представляется изучение влияния свойств различных типов почв и цикличности параметров температуры и влажности в условиях эксперимента на способность осуществлять полный цикл морфофункционального развития культур возбудителя сибирской язвы с различными свойствами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Dragon D.C., Rennie R.P. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can. Vet. J.* 1995;36(5):295–301.
2. Dragon D.C., Bader D.E., Mitchell J., Woollen N. Natural dissemination of *Bacillus anthracis* spores in northern Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(3):1610–5. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.71.3.1610-1615.2005>
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.; 2013. Onishchenko G.G., Kutayev V.V., eds. *Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practical Guide*. Moscow; 2013.
4. Van Ness G.B. Ecology of anthrax. *Science*. 1971;172(3990):1303–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.172.3990.1303>
5. Lee K., Costerton J.W., Ravel J., et al. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology (Reading)*. 2007;153(Pt. 6):1693–701. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003376-0>
6. Saile E., Koehler T.M. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass

plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(5):3168–74.

DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.72.5.3168-3174.2006>

7. Онищенко Г.Г., ред. *Сибирская язва: актуальные проблемы и внедрения медицинских средств защиты*. СПб.; 2018.

Информация об авторах

Котенева Елена Анатольевна[✉] — к.б.н., зав. лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия; доцент каф. общей биологии и биоразнообразия Северо-Кавказского федерального университета, Ставрополь, Россия, postgenom_stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>

Цыганкова Ольга Ивановна — д.м.н., врач-бактериолог лаб. бруцеллеза Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>

Калинин Александр Васильевич — биолог лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>

Абрамович Елена Владимировна — м.н.с. лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>

ЩербакOVA Виктория Юрьевна — лаборант-исследователь лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>.

Родионов Иван Сергеевич — м.н.с. лаб. постгеномных технологий Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>

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

Статья поступила в редакцию 30.12.2022;
принята к публикации 01.03.2023;
опубликована 28.06.2023

Onishchenko G.G., ed. *Anthrax: Current Problems and the Introduction of Medical Means of Protection*. St. Petersburg; 2018.

Information about the authors

Elena A. Koteneva[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia; Associate Professor, Department of general biology and biodiversity, North Caucasian Federal University, Stavropol, Russia, postgenom_stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>

Olga I. Tsygankova — D. Sci. (Med.), bacteriologist, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>

Aleksander V. Kalinin — biologist, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>

Alena V. Abramovich — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>.

Victoriya Yu. Shcherbakova — assistant, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>

Ivan S. Rodionov — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>.

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

The article was submitted 30.12.2022;
accepted for publication 01.03.2023;
published 28.06.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-390>



Состояние специфического иммунитета населения Республики Таджикистан к вирусам кори, краснухи, полиомиелита

Цвиркун О.В.^{1,2✉}, Тихонова Н.Т.¹, Тураева Н.В.¹, Тишкова Ф.М.³, Рузиев М.М.³, Саидзода Ф.Б.⁴, Карпова Е.В.⁵, Иванова О.Е.⁵, Козловская Л.И.⁵

¹Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;

²Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия;

³Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины, Душанбе, Республика Таджикистан;

⁴Республиканский центр иммунопрофилактики, Душанбе, Республика Таджикистан;

⁵Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Для достижения целей программ элиминации кори, краснухи, искоренения полиомиелита необходим охват иммунизацией не менее 95% целевого населения. Объективные данные о состоянии специфического иммунитета представляют только результаты серологических исследований популяционного иммунитета. В Республике Таджикистан такой мониторинг регулярно не проводится, поэтому **целью** нашего исследования являлась оценка фактического состояния иммунитета населения к инфекциям, вызываемым вирусами кори, краснухи, полиомиелита.

Материалы и методы. Исследовали 563 сыворотки крови детей и взрослых, собранные в 7 городах и 13 районах Таджикистана в 2020 г. Уровень антител (АТ) к вирусам кори определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «ВектоКорь-IgG» («Вектор Бест»), АТ к вирусу краснухи — с помощью тест-системы «Эколаб». Нейтрализующие АТ (НАТ) к 3-м типам полиовируса (ПВ) определяли в 359 сыворотках с помощью реакции нейтрализации со штаммами Сэбина типов 1, 2, 3.

Результаты. Уровень серопревалентности к краснухе составил 87,9%, в том числе в группе детей — 86,2%, подростков — 93,1%, взрослых — 93,5%, что достаточно для предотвращения трансмиссии вируса. Доля серопозитивных к кори 54,5% недостаточна для предотвращения устойчивой вторичной передачи инфекции и возобновления циркуляции эндемичного штамма вируса кори. Детское население до 15 лет следует считать группой риска инфицирования, поскольку из 45,5% серонегативных на детей приходилось 38%.

В целом НАТ к ПВ имели менее 95% обследованных: 94,4% к ПВ1, 86,1% к ПВ2, 83,6% к ПВ3; 3,3% не имели АТ ко всем трём типам ПВ. Уровень популяционного иммунитета различался в группах обследованных в зависимости от схемы вакцинации и состава применяемых полиовирусных вакцин: НАТ к ПВ2 имели 59,6% детей, рождённых в период, когда вакцины, содержащие ПВ2, не применялись, а также 85,7% детей, рождённых после внедрения трёхвалентной инактивированной полиовакцины. Дефицит иммунитета к ПВ2 стал в 2021 г. причиной вспышки полиомиелита, вызванной циркулирующим ПВ2 вакцинного происхождения.

Заключение. Определён высокий уровень гуморального иммунитета к вирусу краснухи. Выявлены недостатки плановой иммунопрофилактики в отношении кори и полиомиелита, связанные с недостаточным охватом и отсутствием вакцины. Проведение регулярного серологического мониторинга в Республике Таджикистан целесообразно для получения объективной информации об уровне популяционного иммунитета, выявления уязвимых групп населения, планирования дополнительных иммунизационных мероприятий.

Ключевые слова: корь, краснуха, полиомиелит, популяционный иммунитет, Республика Таджикистан

Этическое утверждение. Отбор сывороток выполнен при добровольном информированном согласии взрослых пациентов, а также законных представителей несовершеннолетних пациентов в рамках государственной программы надзора за корью, краснухой, полиомиелитом в Республике Таджикистан. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (протокол № 61А от 07.10.2022).

Благодарность. Авторы выражают искреннюю признательность С. Бобоназаровой, Ш. Бобоназаровой, А.Г. Герасимовой, Е.С. Колпаковой за помощь в проведении экспериментов, сборе и обработке данных, используемых в данной статье.

Источник финансирования. Исследования выполнялись при поддержке государственного бюджета Республики Таджикистан, федерального бюджета Российской Федерации, предназначенного для выполнения программ надзора за корью, краснухой, полиомиелитом.

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

Для цитирования: Цвиркун О.В., Тихонова Н.Т., Тураева Н.В., Тишкова Ф.М., Рузиев М.М., Саидзода Ф.Б., Карпова Е.В., Иванова О.Е., Козловская Л.И. Состояние специфического иммунитета населения Республики Таджикистан к вирусам кори, краснухи, полиомиелита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):194–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-390> EDN: <https://www.elibrary.ru/oxcwwj>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-390>

The state of specific immunity of population of the Republic of Tajikistan to measles, rubella, poliomyelitis viruses

Olga V. Tsvirkun^{1,2}, Nina T. Tikhonova¹, Natalya V. Turaeva¹, Farida Kh. Tishkova³, Murodali M. Ruziev³, Fayluli B. Saidzoda⁴, Eugenia V. Karpova⁵, Olga E. Ivanova⁵, Liubov I. Kozlovskaya⁵

¹G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;

³Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Tajikistan;

⁴Republican Center for Immunoprophylaxis, Dushanbe, Tajikistan;

⁵Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Science (Institute of poliomyelitis), Moscow, Russia

Abstract

Relevance. To achieve the goals of measles and rubella elimination and poliomyelitis eradication programs, immunization coverage of at least 95% of the target population is required. Objective data on the state of specific herd immunity are provided only by the results of serosurveys. In the Republic of Tajikistan, such monitoring is not carried out regularly. Therefore, **the purpose** of the study was to assess the actual state of the specific herd immunity to measles, rubella, and poliomyelitis viruses.

Materials and methods. The blood sera of 563 children and adults collected in 7 cities and 13 districts of Tajikistan in 2020 were investigated. The level of antibodies (ABs) to measles and rubella viruses was determined using enzyme immunoassay. Test systems VectoKor-IgG (VECTOR-BEST, Russia) and Ecolab, Russia were used to determine ABs to measles and rubella virus, respectively. Neutralizing antibodies (nABs) to the 3 types of poliovirus (PV) were determined in 359 sera using a neutralization reaction with Sabin strains of types 1, 2, 3.

Results. The conducted serosurvey showed the level of the specific herd immunity to rubella to be 87.9% in total population, including 86.2% in children, 93.1% in adolescents, and 93.5% and adults, that is sufficient to prevent transmission of the rubella virus. The proportion of individuals seropositive to measles was 54.5%, which is not enough to prevent sustained secondary transmission of infection and the resumption of circulation of the endemic strain of measles virus. The children under 15 years of age should be considered a population at risk of the infection, since children accounted for 38% among seronegative individuals.

In general, less than 95% of the examined patients had nABs to PV: 94.4% to PV1, 86.1% to PV2, 83.6% to PV3; 3.3% did not have antibodies to all three types of PV. The level of herd immunity varied in the examined groups depending on the vaccination schedule and the composition of the poliovirus vaccines used: nABs to PV2 had 59.6% of children born during the period when vaccines containing PV2 were not used, and 85.7% of children born after the introduction of trivalent IPV. Deficiency in immunity to PV2 was the cause of a polio outbreak in 2021 caused by circulating vaccine-derived PV type 2.

Conclusion. A high level of humoral immunity to the rubella virus was determined. Shortcomings of routine immunization against measles and polio associated with insufficient coverage and lack of IPV have been identified. Conducting regular serological monitoring in the Republic of Tajikistan is advisable to obtain objective information about the level of herd immunity, identify vulnerable groups of the population, and plan additional immunization activities.

Keywords: measles, rubella, poliomyelitis, population immunity, Tajikistan.

Ethics approval. Serum sampling was performed with the voluntary informed consent of adult patients, as well as legal representatives of minor patients within the framework of the state program for the surveillance of measles, rubella, poliomyelitis in the Republic of Tajikistan. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the G.N. Gabrichevsky research institute for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 61A, October 7, 2022).

Acknowledgement. The authors express their sincere gratitude to S. Bobonazarova, Sh. Bobonazarova, A.G. Gerasimova, E.S. Kolpakova for help in carrying out the experiments, collecting and processing the data used in this article.

Funding source. The studies were carried out with the support of the State budget of the Republic of Tajikistan, the Federal budget of the Russian Federation, intended for the implementation of surveillance programs for measles, rubella, poliomyelitis viruses. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):194–202.

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

For citation: Tsvirkun O.V., Tikhonova N.T., Turaeva N.V., Tishkova F.Kh., Ruziev M.M., Saidzoda F.B., Karpova E.V., Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I. The state of specific immunity of population of the Republic of Tajikistan to measles, rubella, poliomyelitis viruses. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):194–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-390> EDN: <https://www.elibrary.ru/oxcwjj>

Введение

Самым действенным методом борьбы с инфекционными заболеваниями является вакцинопрофилактика. К концу XX в. здравоохранение обладало значительным арсеналом эффективных, безопасных, доступных вакцин, успешное применение которых показало возможности радикального снижения заболеваемости и позволило Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) инициировать глобальные программы искоренения натуральной оспы (1958 г.), полиомиелита (1988 г.), элиминации кори и краснухи (2002 г.). Ликвидация натуральной оспы была сертифицирована в 1980 г., программы искоренения полиомиелита и элиминации кори и краснухи находятся в стадии выполнения. Ключевым условием достижения целей этих программ является высокий (не менее 95%) охват иммунизацией и наличие действенного эпидемиологического надзора. Объективным методом оценки состояния специфического иммунитета населения являются серологические исследования популяционного иммунитета. Однако не все страны проводят подобные исследования на регулярной основе. В Республике Таджикистан мониторинг состояния специфического иммунитета к управляемым инфекциям не является обязательным элементом эпидемиологического надзора.

Республика Таджикистан — страна в Центральной Азии с населением более 9 млн человек (из них детей до 15 лет — 3,4 млн), имеет границы с Афганистаном, Узбекистаном, Кыргызстаном, Китаем. Таджикистан входит в состав Европейского региона ВОЗ, принимает участие в программах искоренения полиомиелита и элиминации кори и краснухи. Постановлением Правительства Республики Таджикистан от 28.10.2016 № 456 принята «Национальная программа иммунопрофилактики в Республике Таджикистан на 2016–2020 гг.», в последующем программа была пролонгирована на период 2021–2025 гг. Соответствующие комиссии ВОЗ признали, что в 2016–2019 гг. в Республике Таджикистан была достигнута элиминация кори [1], с 2002 г. страна сертифицирована как «свободная от дикого вируса полиомиелита» [2].

Календарь профилактических прививок против кори и краснухи Таджикистана предусматривает вакцинацию в 12 мес и повторную вакцинацию в 6 лет. Для этой цели применялась бивалентная вакцина корь–краснуха. Однако высокий (97–98%) охват прививками против

кори¹ не обеспечил стабильного эпидемического благополучия. Так, в 2016–2017 гг. была зарегистрирована вспышка кори с 706 пострадавшими. Поэтому с 15 по 26 мая 2017 г. проводились Дни дополнительной иммунизации против кори и краснухи, в течение 12 дней все дети, родившиеся в период с января 2008 г. по май 2016 г., были привиты против кори. Однако в 2022 гг. вновь возникла вспышка кори с 454 заболевшими. Случаи заболевания регистрировались в 18 регионах второго административного уровня, при этом больше половины было зарегистрировано в Душанбе.

В соответствии с календарём профилактических прививок детей вакцинируют против полиомиелита сразу после рождения («0 доза»), затем в 2, 3, 4 мес, ревакцинируют в 12 мес. Последний местный дикий вирус полиомиелита был выделен в Таджикистане в 1994 г.², однако в 2010 г. в стране возникла крупнейшая вспышка, вызванная диким полиовирусом (ПВ) типа 1 [3, 4]. Причиной вспышки был недостаточный, более низкий, чем официально сообщаемый, охват иммунизацией против полиомиелита [3, 5]. В качестве ответных мер были предприняты масштабные кампании по иммунизации в 2010–2011 гг. [6], в последующие годы страна поддерживала высокий (94–97%) уровень охвата вакцинацией против полиомиелита³, дикие ПВ не выявляли. В апреле 2016 г. в соответствии с глобальной стратегией ВОЗ⁴ Таджикистан заменил в схеме рутинной иммунизации трёхвалентную оральную полиовирусную вакцину (тОПВ) на бивалентную (бОПВ) из ПВ типов 1 и 3.

¹ WHO. Measles vaccination coverage. URL: <https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/MCV.html?CODE=TJK&ANTIGEN=MCV2&YEAR=> (дата обращения: 12.05.2023).

² Всемирная организация здравоохранения. Сертификация ликвидации полиомиелита Пятнадцатое совещание Европейской региональной комиссии по сертификации. URL: <https://extranet.who.int/iris/restricted/handle/10665/347456> (дата обращения: 12.05.2023).

³ WHO. Poliomyelitis vaccination coverage. Global; Tajikistan; Polio, 3rd dose. URL: <https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/POL.html?CODE=Global+TJK&ANTIGEN=POL3&YEAR=> (дата обращения: 12.05.2023).

⁴ World Health Organization (WHO). Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018. Geneva: WHO; 2013. URL: https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/PEESP_EN_A4.pdf (дата обращения: 12.05.2023).

Изъятие тОПВ должно было сопровождаться внедрением в Национальный календарь иммунизации одной дозы инактивированной полиовирусной вакцины (ИПВ), содержащей все три типа ПВ. Однако в силу глобального дефицита ИПВ и слабости местной системы здравоохранения ИПВ была внедрена в только в 2018 г., при этом охват 1 дозой ИПВ составил 51%⁵. В 2018 г. в Таджикистане был выявлен случай вакциноассоциированного паралитического полиомиелита у контактного, вызванный ПВ3 [7], в 2020–2021 гг. возникла вспышка (36 случаев), вызванная значительно дивергировавшим от вакцинного предка циркулирующим ПВ2 [8].

Целью исследования является оценка фактического состояния специфического иммунитета населения к вирусам кори, краснухи, полиомиелита.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы сыворотки крови, отбор которых проводили в 2020 г. в рамках скринингового (без учёта прививочного анамнеза) исследования состояния специфического коллективного иммунитета населения к вирусам кори и краснухи в соответствии с договором о научно-практическом сотрудничестве между Московским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского и Институтом профилактической медицины МЗ Республики Таджикистан по элиминации кори и краснухи. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (протокол № 61А от 07.10.2022). Методом случайной выборки были собраны сыворотки крови от 563 человек. Для исследования были доступны сыворотки от детей в возрасте до 15 лет — 427 человек, подростков 15–17 лет — 43 человека, взрослых — 93 человека. Выборка считается репрезентативной, поскольку превышает минимальный показатель репрезентативной выборки от численности населения республики с доверительным интервалом погрешности $\pm 5\%$ и охватывает крупные города (Душанбе, Худжанд, Бохтар, Куляб, Пенджикент, Исфара, Истаравшан) и 13 крупных районов.

Определение уровня антител к кори и краснухе

Уровень противокоревых антител (АТ) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением тест системы «ВектоКорь-IgG» («Вектор Бест»). Учёт полученных результатов проводили согласно прилагаемой инструкции. Результат считался отрицательным, если концентрация IgG к вирусу кори была $\leq 0,12$ МЕ/мл, сомнительным, если показатель составлял $0,12-0,18$ МЕ/мл, и положительным при концентрации $\geq 0,18$ МЕ/мл.

Оценка результатов проводилась в соответствии с принятыми в России критериями эпидблагополучия согласно МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)» — не более 7% серонегативных в каждой индикаторной группе населения, что соответствовало минимальному значению серопозитивных лиц (93%), достаточному для предупреждения устойчивой вторичной передачи инфекции [9].

АТ класса IgG к вирусу краснухи определяли с использованием иммуноферментной тест-системы «Эколаб». Концентрацию АТ рассчитывали в соответствии с инструкцией производителя, пороговой концентрацией считали 10 МЕ/мл, что соответствовало рекомендациям ВОЗ⁶. Сыворотки крови с выявленными АТ в концентрации менее 8 МЕ/мл рассматривались как негативные, в концентрации 8–10 МЕ/мл — как сомнительные, в концентрации более 10 МЕ/мл — как позитивные. Оценку результатов осуществляли с помощью порогового уровня (83–85% серопозитивных лиц [9]), достаточного для предотвращения трансмиссии вируса, по трем группам населения: дети, взрослые, всё население.

Серонегативные к вирусу кори сыворотки крови подвергались повторному исследованию другой тест-системой — «Эколаб».

Для статистической обработки данных исследования использовали прикладные пакеты программы «Microsoft Excel». В связи с отсутствием статистически значимых различий в показателях серопозитивных лиц среди мужчин и женщин в исследованиях популяционно-иммунитета к вирусу краснухи по данным литературы [10, 11], гендерные различия в наших исследованиях не учитывались.

Определение уровня гуморального иммунитета к вирусу полиомиелита

Показателем состояния специфического иммунитета к вирусу полиомиелита является уровень гуморального иммунитета, который определяют в реакции нейтрализации с референс-штаммами ПВ типов 1, 2, 3. Реакцию микронейтрализации выполняли в соответствии с рекомендациями ВОЗ⁷ на культуре клеток HEp-2 (Cincinnati), в качестве референс-штаммов использовали штаммы Сэбина типов 1, 2, 3, полученные из источника, одобрен-

⁵ WHO. Global; Tajikistan; Inactivated polio-containing vaccine, 1st dose. URL: <https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/POL.html?CODE=Global+TJK&ANTIGEN=IPV1&YEAR=> (дата обращения: 12.05.2023).

⁶ WHO. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome; 2018. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/lab_networks/measles_rubella/manual/chapter-1.pdf?sfvrsn=f7f1fc1d_2&download=true (дата обращения: 12.05.2023).

⁷ WHO. Manual for virological investigation of poliomyelitis; 1997. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/62186/WHO_EPI_CDS_POLIO_90.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y (дата обращения: 12.05.2023).

ного ВОЗ (Национальный институт биологических стандартов и контроля, Великобритания).

Для исследования было доступно 359 сывороток. Сыворотки титровали, начиная от разведения 1 : 8 до 1 : 1024. Разведение 1 : 8 принимали как наименьшее, свидетельствующее о наличии вируснейтрализующих АТ (нАТ) к ПВ. В качестве положительного контроля использовали референс-сыворотку с известным титром нАТ. Учёт реакции проводили на 5-е сутки. Титр нАТ рассчитывали по формуле Кербера.

Результаты

Результаты определения иммунитета к вирусу кори и краснухи

Анализ результатов обследования показал, что специфические АТ класса IgG к вирусу кори определялись только у 54,5% обследованных лиц; остальные 45,5% оказались серонегативными к вирусу кори (**рис. 1**).

Это свидетельствует о формировании значительной когорты чувствительных к кори лиц и риске возобновления эндемичной передачи вируса кори [12].

Иные результаты получены при исследовании сывороток крови на наличие АТ к вирусу краснухи: серонегативными оказались лишь 12,1% обследованных, остальные 87,9% имели специфические АТ, что указывает на эпидемическое благополучие в отношении краснухи.

Мы попытались проследить, какая группа населения — дети, подростки или взрослые — являются группой риска возникновения и устойчивого вторичного распространения кори. Из 45,5% серонегативных к вирусу кори лиц на детей приходилось 38% ($n = 214$), подростков — 3% ($n = 17$), взрослых — 4,5% ($n = 25$). Последующий анализ удельного веса серонегативных к вирусам кори и краснухи лиц от числа обследованных в группе детей, подростков и взрослых (**табл. 1**) показал, что половина обследованных детей не имели антител к вирусу кори, тогда как серонегативных к вирусу краснухи выявлено лишь 13,8%.

Аналогичная ситуация наблюдается при анализе результатов в группе подростков: доля серонегативных к вирусам кори — 39,5%, краснухи — 6,9%; и взрослых — 26,9 и 6,5% соответственно. Однако результаты нельзя считать достоверными из-за малого числа обследуемых (43 и 93%).

Результаты выборочного обследования 563 человек были дополнительно проанализированы с учётом воз-

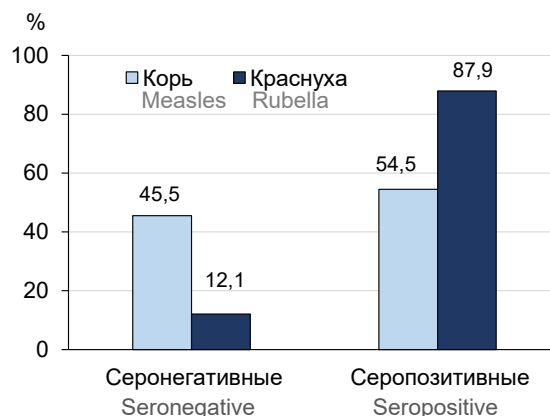


Рис. 1. Частота распределения сероположительных и сероотрицательных к вирусам кори и краснухи обследованных в 2020 г.

Fig. 1. The proportion of seropositive and seronegative to measles and rubella viruses in individuals examined in 2020.

можных вариантов наличия или отсутствия специфических АТ и к кори, и к краснухе (**табл. 2**).

Так, у 284 (50,4%) обследованных человек были выявлены АТ и к кори, и к краснухе; 23 (4,1%) человека оказались серопозитивными к вирусу кори, но серонегативными к вирусу краснухи; 211 (37,5%) — серонегативны к кори, но имели АТ класса G к краснушной инфекции; у 45 (8,0%) человек не определялись АТ ни к вирусу кори, ни к вирусу краснухи.

Особый интерес представляют данные о практически равном числе серонегативных и серопозитивных к вирусу кори и краснухи детей во всех возрастных группах. Исключение составляют дети 6 и 7 лет, где число детей, имеющих АТ к вирусу кори, несколько больше, чем число детей, АТ не имеющих, что, видимо, можно объяснить стремлением некоторых родителей привить детей перед поступлением в школу. При краснухе положение с состоянием иммунитета значительно лучше: в каждом возрасте большинство детей имеют АТ к вирусу краснухи, за исключением детей до 1 года. В группе детей 11 лет восприимчивых к краснухе не выявлено.

Таким образом, проведённое скрининговое исследование состояния иммунитета населения Республики Таджикистан на наличие АТ к вирусам кори и краснухи показало существенное различие в удельном весе серонегативных и серопозитивных результатов к этим инфекциям. Так, при исследовании сывороток на наличие АТ к вирусу

Таблица 1. Показатель серонегативных к вирусам кори и краснухи от числа обследованных детей, подростков и взрослых ($n = 563$)

Table 1. The proportion of children, adolescents and adults seronegative to measles and rubella viruses among examined individuals ($n = 563$)

Инфекционные заболевания Infectious diseases	Дети Children $n = 427$			Подростки Adolescents $n = 43$			Взрослые Adults $n = 93$		
	n	%	95,5% ДИ CI	n	%	95,5% ДИ CI	n	%	95,5% ДИ CI
Корь Measles	214	50,1	45,3–54,9	17	39,5	24,5–54,5	25	26,9	17,7–36,1
Краснуха Rubella	59	13,8	12,6–15,0	3	6,9	0–14,7	6	6,5	1,3–11,7

Таблица 2. Варианты соотношения серопозитивных/серонегативных к вирусам кори и краснухи среди обследованных лиц

Table 2. Variants of the ratio of seropositive/seronegative to measles and rubella viruses among the examined individuals

Комбинация наличие/отсутствие IgG АТ к вирусам кори и краснухи Variants of the ratio of seropositive/seronegative	<i>n</i>	%	95,5% ДИ CI
Корь-позитивные, краснуха-позитивные Measles positive, rubella positive	284	50,4	48,8–52,0
Корь-позитивные, краснуха-негативные Measles positive, rubella negative	23	4,1	0,2–8,0
Корь-негативные, краснуха-позитивные Measles negative, rubella positive	211	37,5	35,2–39,8
Корь-негативные, краснуха-негативные Measles negative, rubella negative	45	8,0	0,4–15,6
Всего Total	563	100	

кори, соотношение доли серонегативных и серопозитивных результатов составило 45,5 и 54,5% соответственно. Соотношение лиц, имеющих и не имеющих АТ к вирусу краснухи, составило 12,1 и 87,9% соответственно. Важно отметить, что половина обследованных детей (50,1%) не имела АТ к вирусу кори, что обуславливает высокую эпидемическую значимость данной группы населения.

Результаты определения иммунитета к вирусу полиомиелита

Результаты определения нАТ в 359 сыворотках показали, что нАТ к ПВ1 имели 339 (94,4%) человек, к ПВ2 — 309 (86,1%), к ПВ3 — 300 (83,6%). Сыворотки от 12 (3,3%) человек не содержали нАТ ко всем трём типам ПВ. Средний геометрический титр нАТ к ПВ1 со-

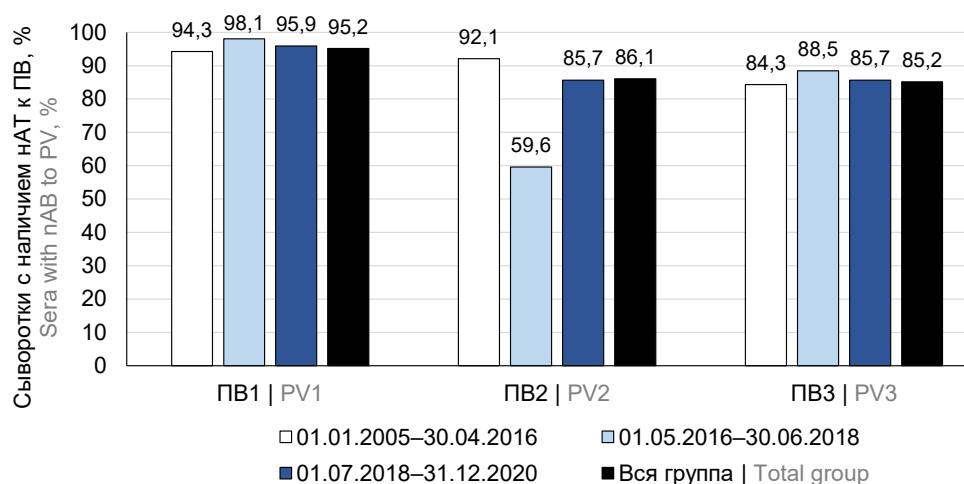


Рис. 2. Результаты исследования сывороток на наличие нАТ к ПВ типов 1, 2, 3 в различных возрастных группах обследованных.

Fig. 2. The results of testing of the sera for the presence of neutralizing antibodies (nABs) to poliovirus (PV) types 1, 2, 3 in various age groups.

Таблица 3. Количество сывороток без нАТ к ПВ в различных возрастных группах

Table 3. The number of sera without neutralizing antibodies (nABs) to polioviruses in different age groups

Тип ПВ PV type	Дата рождения и количество сывороток с титром нАТ < 1 : 8 Date of birth and number of sera with nABs titer < 1 : 8							
	2005–30.05.2016 <i>n</i> = 229		01.05.2016–30.06.2018 <i>n</i> = 52		01.07.2018–2020 <i>n</i> = 49		всего total <i>n</i> = 330	
	полиовирусные вакцины poliovirus vaccines							
	тОПВ tOPV		бОПВ bOPV		ИПВ, бОПВ IPV, bOPV			
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
ПВ1 PV1	13	5,7	1	1,9	2	4,1	16	4,8
ПВ2 PV2	18	7,9	21	40,4	7	14,3	46	13,9
ПВ3 PV3	36	15,7	6	11,5	7	14,3	49	14,8

ставил $7,04 \pm 0,14$ (1 : 132), к ПВ2 — $5,83 \pm 0,15$ (1 : 56), к ПВ3 — $5,18 \pm 0,16$ (1 : 36).

С учётом изменения схемы вакцинации против полиомиелита в Таджикистане, состава (3 типа ПВ, 2 типа ОПВ) и вида использованных вакцин (тОПВ, БОПВ, ИПВ), для анализа сывороток мы выделили группы исследованных в зависимости от даты рождения (рис. 2, табл. 3): 1-я группа — рождённые в период 01.01.2005–30.04.2016, 2-я — в период 01.05.2016–30.06.2018, 3-я — в период 01.07.2018–31.12.2020.

В целом в этой выборке более 95% сывороток содержали нАТ к ПВ1 (95,2%), серопревалентность к ПВ2 составила 86,1%, к ПВ3 — 85,2% (рис. 2).

Мы выявили высокий уровень популяционного иммунитета к ПВ1 во всех возрастных группах — 94,3, 98,1 и 95,9% в 1, 2 и 3-й группах соответственно. АТ к ПВ2 имели менее 95% исследованных во всех группах, наибольшее количество лиц без нАТ к ПВ2 (40,4%) было в группе рождённых в период 01.05.2016–30.06.2018 (табл. 3). В этот период в Таджикистане использовали только БОПВ, не содержащую ПВ2. Значительное количество серонегативных к ПВ2 (14,3%) сохранялось и в следующей группе. В это время начали применять трёхвалентную ИПВ, но охват одной дозой ИПВ в 2019 г. составил 51%. АТ к ПВ3 имели менее 95% детей во всех возрастных группах — 84,3, 88,5 и 85,7% соответственно.

Обсуждение

Корь, краснуха

Проведённое исследование состояния специфического иммунитета к вирусу краснухи показало уровень иммунитета населения — 87,9%, в том числе в группе детей — 86,2%, подростков — 93,1% и взрослых — 93,5%, достаточный для предотвращения трансмиссии вируса, что подтверждает эпидемическое благополучие в стране в отношении данной инфекции [9, 13]. Аналогичная ситуация по краснухе была отмечена и в других странах [10, 11, 14]. Анализ соотношения серопозитивных и серонегативных лиц в каждой возрастной группе до 15 лет показал преобладание серопозитивных к вирусу краснухи в каждом возрасте, за исключением детей до 1 года (не подлежащих вакцинации по возрасту). Наибольший относительный показатель невосприимчивых к краснухе выявлен у детей в возрасте 11 лет (100%) и 6 лет (89,7%). Наименьший показатель (63,6%) — в возрастной группе 4 года. Вероятно, это связано с малым количеством обследованных в этом возрасте. Выявить достоверность различий между показателями серонегативных лиц среди детей до 15 лет и возрастную группу риска инфицирования не удалось.

Уровень специфического иммунитета у населения Таджикистана к кори оказался недостаточным для предотвращения устойчивой вторичной передачи инфекции и возобновления циркуляции эндемического штамма вируса кори. Доля серопозитивных и серонегативных распределилась практически поровну — 54,5 и 45,5% соответствен-

но. При этом детское население до 15 лет следует считать группой риска инфицирования, поскольку из 45,5% серонегативных лиц на детей приходилось 38%. Подростки и взрослые оказались защищены от кори намного лучше, доля восприимчивых составила всего 3 и 4,5% соответственно. Подобное распределение восприимчивых к кори лиц отмечали исследователи в других странах [15]. Возможно, это связано с формированием не только поствакцинального, но и постинфекционного иммунитета в этих возрастных группах. Причины высокой доли серонегативных лиц, выявляемых на фоне поддержания высокого (более 95%) охвата прививками против кори детского населения, нуждаются в более углублённом изучении.

Ведущая роль детского населения в поддержании эпидемического процесса кори в стране подтвердилась во время вспышки кори, зарегистрированной в 2022 г., когда в структуре заболевших (454) дети составили около 90%. Мы сопоставили относительные показатели заболеваемости различных групп населения, без учёта детей 1-го года жизни, не подлежащих вакцинации по возрасту, с показателями серонегативных к кори лиц в этих группах и установили, что доля заболевших корью детей в возрасте 1–10 лет (61,6%) практически совпадает с долей серонегативных в этой возрастной группе (67,2%). Некоторое несоответствие проявилось только внутри этой группы: заболеваемость корью в 2022 г. определяли дети 1–4 лет (36,0%), тогда как самый высокий процент серонегативных к кори лиц в 2020 г. определялся в группе детей 5–10 лет (41,8%). Можно предположить, что темпы увеличения непривитых в группе детей 1–4 лет увеличились в 2021 г., что и обусловило активное их вовлечение в эпидемический процесс кори.

Полиомиелит

В целом мы выявили достаточно высокий уровень гуморального иммунитета к ПВ трёх типов у детей Таджикистана, особенно к ПВ1 (1 : 132). Однако количество детей, имеющих нАТ, было различным как в отношении типов ПВ, так и в разных возрастных группах. Количество детей, имеющих нАТ к ПВ1, было больше, чем количество детей с нАТ к ПВ2 и ПВ3, эту тенденцию наблюдали и в каждой из групп. Это не вполне согласуется с известными данными о том, что при использовании тОПВ наиболее активно формируется иммунитет к ПВ2, затем к ПВ1 и ПВ3 [16, 17]. Очевидно, что значительное влияние на формирование высокого уровня популяционного иммунитета к ПВ1 оказала циркуляция дикого ПВ1 в 2010 г., а также неоднократные дополнительные мероприятия по иммунизации (ДМИ). В 2010 г. для подавления вспышки использовали как тОПВ (2 раунда), так и моновалентную ОПВ типа 1 (5 раундов) [3, 5], в 2011 г. было организовано 2 раунда ДМИ с использованием тОПВ. В течение 10 лет этот уровень, в значительной степени достигнутый за счёт ДМИ, обеспечивал эпидемиологическое благополучие в отношении полиомиелита. До декабря 2020 г. (когда возникла новая вспышка) дикие и ПВВП в Таджикистане не были выявлены.

В целом 86,1% детей имели нАТ к ПВ2, что ниже рекомендуемого уровня 95%, но наиболее ярко дефицит иммунитета к ПВ2 проявился в группе детей, рождённых в период 01.05.2016–30.06.2018, когда вакцины, содержащие этот тип ПВ, не применялись — 40,4% серонегативных. Среди детей, рождённых после внедрения ИПВ в национальный календарь (01.07.2018–31.12.2020), только 85,7% детей имели нАТ к ПВ2, что указывает на недостаточный охват иммунизацией⁸. Дефицит иммунитета к ПВ2 стал причиной циркуляции в Таджикистане занесённого из афгано-пакистанского кластера цПВВП, что привело к возникновению в 2020–2021 г. вспышки полиомиелита [15].

Серопревалентность к ПВ3 также оказалась ниже 95% (85,2%), эту тенденцию наблюдали во всех возрастных группах. Более низкая серопревалентность к ПВ3 в Таджикистане уже была установлена ранее в исследовании, выполненном N. Khetsuriani и соавт. [5]. Наши данные подтверждают меньшую длительность сохранения нАТ к ПВ3 по сравнению с ПВ1 и ПВ2 [16], одновременно указывая на недостаточный охват плановой иммунизацией в течение длительного периода времени.

Заключение

Результаты серологических исследований состояния специфического иммунитета к вирусу краснухи свидетельствуют об эпидемическом благополучии в отношении этой инфекции, что подтверждается спорадическим уровнем заболеваемости. Высокая доля серонегативных лиц к вирусу кори практически в каждой возрастной группе старше 12 мес подтвердила целесообразность периодического проведения дополнительных прививочных кампаний против кори не только «догоняющих», но и при необходимости без учёта прививочного анамнеза [18]. Сопоставление результатов скрининговых серологических исследований состояния иммунитета к вирусу кори на национальном уровне и повозрастное распределение заболевших корью во время вспышки 2022 г. продемонстрировало возможность использования этого метода для прогнозирования эпидемической ситуации и разработки дополнительных профилактических мероприятий.

Исследования специфического иммунитета к ПВ подтвердили высокую эффективность ДМИ для поддержания необходимого уровня коллективного иммунитета и выявили недостатки плановой иммунопрофилактики в стране в период 2011–2020 гг. (недостаточный охват и недоступность ИПВ в период 2016–2018 гг.), что привело к вспышке полиомиелита в 2020–2021 гг. Проведение регулярного серологического мониторинга в Республике Таджикистан целесообразно для получения объективной информации об уровне популяционного иммунитета. Получаемые данные станут основой для выявления уяз-

вимых групп населения, планирования дополнительных иммунизационных мероприятий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. O'Connor P., Jankovic D., Zimmerman L., et al. Progress toward rubella elimination – World Health Organization European Region, 2005–2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2021;70(23):833–9. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7023a1>
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Certification of poliomyelitis eradication – European Region, June 2002. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2022;51(26):572–4.
3. Yakovenko M.L., Gmyl A.P., Ivanova O.E., et al. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2014;19(7):20706. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.7.20706>
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks following wild poliovirus importations – Europe, Africa and Asia, January 2009 – September 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2010;59(43):1393–9.
5. Khetsuriani N., Pallansch M.A., Jabirov Sh., et al. Population immunity to polioviruses in the context of a large-scale wild poliovirus type 1 outbreak in Tajikistan, 2010. *Vaccine.* 2013;31(42):4911–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.106>
6. Khetsuriani N., Pfeifer D., Deshevoi S., et al. Challenges of maintaining polio-free status of the European region. *J. Infect. Dis.* 2014;210(Suppl. 1):S194–207. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu096>
7. Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I., Eremeeva T.P., et al. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in a child: fast transformation from Sabin-like virus to vaccine-derived poliovirus triggered an epidemiological response in two countries of the European region. *Int. J. Infect. Dis.* 2022;125:35–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.09.034>
8. O'Connor P., Huseynov S., Nielsen C.F., et al. Notes from the field: readiness for use of type 2 novel oral poliovirus vaccine in response to a type 2 circulating vaccine-derived poliovirus outbreak – Tajikistan, 2020–2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2022;71(9):361–2. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7109a4>
9. Fine P.E.M., Mulholland K., Scott J.A., Edmunds W.J. Community protection. In: *Plotkin's Vaccines.* Elsevier; 2018: 1512–31.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00077-8>
10. Borràs E., Campins M., Esteve M., et al. Are healthcare workers immune to rubella? *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014;10(3): 686–91. DOI: <https://doi.org/10.4161/hv.27498>
11. Hyde T.B., Kruszon-Moran D., McQuillan G.M., et al. Rubella immunity levels in the United States population: has the threshold of viral elimination been reached? *Clin. Infect. Dis.* 2006;43(Suppl. 3):146–50. DOI: <https://doi.org/10.1086/505947>
12. Strebel P.M., Papania M.J., Gastañaduy P.A., Goodson J.L. Measles vaccines. In: *Plotkin's Vaccines.* Elsevier; 2018: 579–618.e21. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00037-7>
13. Reef S.E., Plotkin S.A. Rubella vaccines. In: *Plotkin's Vaccines.* Elsevier; 2018: 970–1000.e18. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00052-3>
14. Цвиркун О.В., Самойлович Е.О., Тихонова Н.Т. и др. Сопоставление результатов исследования состояния популяционного иммунитета к вирусу краснухи у населения Республики Беларусь и Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет.* 2022; 12(5): 909–18. Tsvirkun O.V., Samoilovich E.O., Tikhonova N.T., et al. State of anti-rubella virus population immunity in the Republic of Belarus

⁸ WHO. Global; Tajikistan; Inactivated polio-containing vaccine, 1st dose. Available at: [https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/POL.html?CODE=Global+TJK&ANTIGEN=IPV1&YEAR=\(дата обращения: 12.05.2023\)](https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/POL.html?CODE=Global+TJK&ANTIGEN=IPV1&YEAR=(дата обращения: 12.05.2023)).

and Russian Federation. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(5):909–18.

DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-COT-1832>

15. Mirzoev A., Macklin G.R., Zhang Y., et al. Assessment of serological responses following vaccination campaigns with type 2 novel oral polio vaccine: a population-based study in Tajikistan in 2021. *Lancet Glob. Health*. 2022;(12):e1807–14. DOI: [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(22\)00412-0](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(22)00412-0)
16. Sutter R.W., Kew O.M., Cochi S.L., Aylward R.B. Poliovirus vaccine – live. In: *Plotkin's Vaccines*. Elsevier; 2018: 866–917. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00048-1>

Информация об авторах

Цвиркун Ольга Валентиновна[✉] — д.м.н., г.н.с., рук. отдела эпидемиологии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия; доцент каф. инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия, o.tsvirkun@gabrich.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3810-4804>

Тихонова Нина Тимофеевна — д.б.н., профессор, г.н.с. лаб. цитокинов, руководитель Национального научно-методического центра по надзору за корью и краснухой МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8762-4355>

Тураева Наталья Викторовна — к.м.н., в.н.с., руководитель лаб. профилактики вирусных инфекций МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7657-4631>

Ташкова Фарида Хаматгалиевна — д.м.н., профессор, руководитель лаб. вакциноуправляемых инфекций Таджикского научно-исследовательского института профилактической медицины, Душанбе, Республика Таджикистан, <https://orcid.org/0000-0001-5034-5005>

Рузиев Муродали Мехмондустович — д.м.н., директор Таджикского НИИ профилактической медицины, Душанбе, Республика Таджикистан, <https://orcid.org/0000-0001-6267-9483>

Сайдзода Файлули Барто — директор Республиканского центра иммунопрофилактики, Душанбе, Республика Таджикистан

Карпова Евгения Викторовна — м.н.с. лаб. полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1153-0958>

Иванова Ольга Евгеньевна — д.м.н., в.н.с. лаб. полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1784-4827>

Козловская Любовь Игоревна — к.б.н., рук. лаб. полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>

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

Статья поступила в редакцию 12.04.2023;
принята к публикации 15.06.2023;
опубликована 28.06.2023

17. WHO. Polio vaccines: WHO position paper – June 2022. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2022; 25(97): 277–300.

18. Ниязалиева М.С., Цвиркун О.В., Тойгомбаева В.С. и др. Характеристика эпидемического процесса кори в Кыргызской Республике. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021;20(4):79–88. Niyazalieva M.S., Tsvirkun O.V., Toigombaeva V.S., et al. The characteristic of measles epidemic process in Kyrgyz Republic. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(4):79–88. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-4-79-88>

Information about the authors

Olga V. Tsvirkun[✉] — D. Sci. (Med.), main researcher, Head, Department of epidemiology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Associate Professor, Department of infectious diseases with courses in epidemiology and phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia, o.tsvirkun@gabrich.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3810-4804>

Nina T. Tikhonova — D. Sci. (Biol.), Professor, main researcher, Laboratory of cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8762-4355>

Natalya V. Turaeva — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Laboratory for the prevention of viral infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7657-4631>

Farida Kh. Tishkova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of vaccine-preventable infections, Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Tajikistan, <https://orcid.org/0000-0001-5034-5005>

Murodali M. Ruziev — D. Sci. (Med.), Director, Tajik Research Institute of Preventive Medicine; Dushanbe, Tajikistan, <https://orcid.org/0000-0001-6267-9483>

Fayluli B. Saidzoda — Director, Republican Center for Immunoprophylaxis, Dushanbe, Tajikistan

Eugenia V. Karpova — junior researcher, Laboratory of poliomyelitis and other enterovirus infections with the WHO reference center for the surveillance for poliomyelitis, Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Science (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1153-0958>

Olga E. Ivanova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of poliomyelitis and other enterovirus infections with the WHO reference center for the surveillance for poliomyelitis, Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Science (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1784-4827>

Liubov I. Kozlovskaya — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of poliomyelitis and other enterovirus infections with the WHO reference center for the surveillance for poliomyelitis, Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Science (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>

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

The article was submitted 12.04.2023;
accepted for publication 15.06.2023;
published 28.06.2023



Сравнительная оценка ферментативной и биоцидной активности *Candida auris* и *Candida albicans*

Игнатова Н.И.✉, Заславская М.И., Александрова Н.А., Лапшина А.А.,
Махрова Т.В., Лукова О.А.

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Введение. Важную роль в реализации патогенности *Candida* spp. играют секретируемые продукты метаболизма, обладающие ферментативными или токсическими свойствами. Наиболее клинически значимым видом считается *C. albicans*, однако всё большую актуальность приобретает *C. auris*, часто вызывающая инвазивные инфекции.

Цель работы — сравнение некоторых ферментативных свойств и биоцидной активности *C. auris* и *C. albicans*.

Материалы и методы. Исследования проводили на штаммах *C. albicans* и *C. auris*. Оценивали рост микромицетов на мясо-пептонном агаре, среде Сабуро или кровяном агаре (с учётом гемолиза). Способность *Candida* spp. расщеплять белки выявляли на агаре Дифко с 2% казеином и по воздействию на молекулы IgG. Липазную активность кандид оценивали на агаре, содержащем Твин-20. Жизнеспособность буккальных эпителиоцитов после воздействия (1–4 ч) метаболитов кандид оценивали с помощью трипанового теста. Статистическую обработку проводили с использованием программы «RStudio».

Результаты. *C. albicans* лучше всего росли на агаре Сабуро, а *C. auris* — на кровяном агаре. Гемолитическая и липазная активность была характерна только для *C. auris*. Наличие протеазной активности было отмечено для некоторых штаммов *C. auris*: они были способны расщеплять казеин и повреждать структуру молекул IgG. Продукты метаболизма некоторых штаммов кандид снижали жизнеспособность эпителиальных клеток, при этом кратность снижения была более выражена в экспериментах с *C. auris* ($p < 0,05$).

Заключение. Наиболее благоприятной средой для культивирования *C. auris* является кровяной агар. Выраженная протеолитическая, антиглобулиновая, гемолитическая и общая липазная активности были отмечены только у исследуемых штаммов *C. auris*, что показывает их более высокий инвазивный потенциал по сравнению с *C. albicans*. Биоцидная активность микромицетов в отношении буккальных эпителиоцитов имела штамм-зависимый характер.

Ключевые слова: *Candida* spp., метаболиты, факторы патогенности, ферменты, биоцидность

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

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

Для цитирования: Игнатова Н.И., Заславская М.И., Александрова Н.А., Лапшина А.А., Махрова Т.В., Лукова О.А. Сравнительная оценка ферментативной и биоцидной активности *Candida auris* и *Candida albicans*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):203–209.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-301> EDN: <https://www.elibrary.ru/pdzngc>

Comparative evaluation of enzyme and biocidal activity of *Candida auris* and *Candida albicans*

Nadezhda I. Ignatova✉, Maya I. Zaslavskaya, Natalya A. Aleksandrova,
Anna A. Lapshina, Tatyana V. Makhrova, Olga A. Lukova

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

Introduction. Secreted metabolites with enzymatic or toxic properties are important for effecting of *Candida* spp pathogenicity. The most clinically significant species is *C. albicans*. However,— invasive infections associated with *C. auris* have a great significance.

The aim of the investigation is comparison the some of enzymatic properties and biocidal activity of *C. auris* with those of *C. albicans*.

Materials and methods. *C. albicans* and *C. auris* strains were used in the study. Growth of micromycetes was detected on nutrient agar, Sabouraud agar or blood agar (with hemolysis presence). The *Candida* spp. proteinase activity was determined on Difco agar with 2% casein and by cleavage of IgG molecules. *Candida* lipase activity was assessed on the agar with Tween-20. The viability of buccal epithelial cells after exposure (1 – 4 h) with *Candida* metabolites was estimated by trypan blue assay. Statistical analysis was performed using RStudio software.

Results. The best growth of *C. albicans* was observed on Sabouraud agar, and *C. auris* on blood agar. Only *C. auris* had hemolytic and lipase activity. Protease activity of some *C. auris* strains was noted. They were able to cleave casein and damage IgG molecules. The metabolites of some *Candida* strains decreased the viability of epithelial cells while the reduction was more pronounced in the experiments with *C. auris* ($p < 0.05$).

Conclusion. The most suitable medium for *C. auris* culturing was blood agar. Proteolytic, antiglobulin, hemolytic and lipase activities were observed only for *C. auris*. *C. auris* demonstrated more invasive capacity compared to *C. albicans*. The observed micromycete biocidal activity against buccal epithelial cells was strain-dependent.

Keywords: *Candida* spp., metabolites, pathogenicity factors, enzymes, biocidity

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

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

For citation: Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., Lapshina A.A., Makhrova T.V., Lukova O.A. Comparative evaluation of enzyme and biocidal activity *Candida auris* and *Candida albicans*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):203–209.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-301> EDN: <https://www.elibrary.ru/pdznge>

Введение

Микроскопические грибы рода *Candida* — представители факультативной микрофлоры человека — могут быть причиной развития оппортунистических микозов [1]. Патогенный потенциал кандид обусловлен наличием у них различных структур и молекул, способствующих адгезии, субэпителиальной инвазии и обеспечивающих противодействие эффекторам иммунитета. Спектр факторов патогенности может зависеть как от вида, так и от штамма кандид, делая отдельных представителей более вирулентными в отношении клеток и тканей человека.

Важную роль в реализации патогенности играют секретлируемые факторы *Candida* spp., обладающие ферментативными и/или токсическими свойствами, такие как кандидализин (цитолитический пептид), фосфолипаза В [2]. Протеиназы микромицетов могут принимать участие в проникновении микромицетов в ткани и уклонении от иммунной системы организма хозяина [3].

Наиболее клинически значимым видом среди кандид считается *C. albicans*, на долю которого приходится большинство случаев кандидозов различной локализации [4]. Однако всё большую актуальность приобретает эмерджентный патоген — *C. auris*, отличающийся высокой способностью к инвазии. Сравнение геномов этих двух видов кандид ранее показало, что *C. auris* обладает способностью адаптироваться к различным условиям окружающей среды и имеет множество факторов пато-

генности, общих с *C. albicans* и другими видами *Candida* [5]. В то же время *C. auris*-ассоциированные инфекции часто приводят к развитию системных микозов и характеризуются высоким уровнем летальности, особенно у иммунокомпрометированных пациентов и пожилых людей [5].

Целью данного исследования явилось сравнение некоторых ферментативных свойств и бицидной активности *C. auris* и *C. albicans*.

Материалы и методы

Исследования проводили на *C. albicans* (штаммы 195, 258, 290, 601) и *C. auris* (штаммы 70, 78, 84, 95) из коллекции кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета. Исследуемые штаммы были получены из клинического материала от больных с манифестной формой инфекции в 2021 г., депонировались в коллекцию кафедры и поддерживались путём субкультивирования согласно требованиям СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Для получения метаболитов клетки кандид выращивали в бульоне Сабуро (24 ч, 37°C). Метаболиты отделяли от клеток при помощи стерильных бактериальных фильтров («Corning»). Для оценки роста колоний производили посев 0,05 мл суспензии кандид с концентрацией 5×10^2 кл/мл на мясо-пептонный агар (МПА), плотную среду Сабуро или кро-

вяной агар. После инкубации (48 ч, 37°C) производили измерение диаметра выросших колоний.

Для оценки протеазной активности в качестве модельных субстратов, расщепление которых можно было зафиксировать визуально либо спектрофотометрически, были взяты крупные сложные белки, такие как казеин («HiMedia») и иммуноглобулин класса G (IgG) («Микроген НПО»). Данные белки имеют большое разнообразие типов связей между аминокислотами и могут расщепляться различными протеазами. Способность метаболитов *Candida spp.* расщеплять казеин оценивали путём посева кандид на модифицированный агар Дифко, содержащий 2% соответствующего протеина. После культивирования кандид (48 ч, 37°C) в чашки наливали 5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты и наблюдали в течение 3 мин за появлением прозрачных зон гидролиза вокруг колоний *Candida spp.* [6].

Способность расщеплять молекулы IgG под действием метаболитов кандид оценивали по остаточной антигенсвязывающей активности антител с использованием набора для иммуоферментного анализа (ИФА) для определения интерлейкина-6 («Вектор-Бест») [7]. В лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами добавляли 200 мкл метаболитов кандид; в качестве контроля использовали стерильный бульон Сабуро. Планшет инкубировали в термостате 1 ч при 37°C, затем проводили ИФА согласно протоколу производителя («Вектор-Бест») [8].

Общую липазную активность кандид оценивали путём культивирования (48 ч, 37°C) на агаре, содержащем Твин-20. О продукции кандидами липаз можно судить по образованию матовых ореолов вокруг колоний микромицетов [6].

Гемолитическую активность штаммов *Candida spp.* оценивали вокруг колоний кандид, выросших (48 ч, 37°C) на кровяном агаре. Отмечали

наличие или отсутствие зоны гемолиза вокруг колоний [6].

Биоцидную активность метаболитов кандид оценивали в отношении буккальных эпителиоцитов (10^6 кл/мл), которые инкубировали с метаболитами кандид в течение 1–2–3–4 ч при 37°C. Жизнеспособность эпителиоцитов определяли с помощью трипанового теста, подсчитывая процент живых клеток в суспензии [9].

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерной программы «RStudio». Данные каждой выборки проверяли на нормальность распределения и представляли в виде группового среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (δ). Межгрупповые различия анализировали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни для малых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Оценивали возможность *C. auris* и *C. albicans* утилизировать различный набор субстратов, входящих в основу стандартных питательных сред для культивирования микроорганизмов. Культивирование на трех типах питательных сред показало, что для всех штаммов *C. albicans* наиболее благоприятной средой являлся агар Сабуро (**табл. 1**): размер колоний был больше, чем на МПА или кровяном агаре, в 1,98 раза. Отметим, что выраженность признака (размер колоний) носила штамм-специфический характер. Штаммы *C. auris* предпочитали агар Сабуро более, чем МПА, но лучше всего рост наблюдался на кровяном агаре, что проявлялось в увеличении размера выросших колоний по сравнению с микромицетами, выросшими на МПА, в 1,8 и 2,3 раза соответственно (**табл. 1**).

С целью исследования способности извлекать гемоглобин из эритроцитов определяли наличие зон

Таблица 1. Размер колоний штаммов *C. albicans* и *C. auris* в зависимости от типа культуральной среды, $M \pm \delta$
Table 1. Colony size of *C. albicans* and *C. auris* strains depending on the type of culture medium, $M \pm \delta$

Штамм Strain	Размер колоний, мм Colony size, mm			
	мясо-пептонный агар nutrient agar	агар Сабуро Sabouraud agar	кровоной агар blood agar	
<i>C. albicans</i>	195	1,25 ± 0,38	2,75 ± 0,65*	1,72 ± 0,27
	258	2,38 ± 0,48	4,50 ± 0,58*	1,70 ± 0,27
	290	1,64 ± 0,47	2,30 ± 0,92	1,45 ± 0,37
	601	1,78 ± 0,62	4,38 ± 0,48*	2,17 ± 0,26
<i>C. auris</i>	70	1,50 ± 0,25	2,13 ± 0,23*	3,63 ± 0,74*
	78	0,92 ± 0,20	2,25 ± 0,27*	3,80 ± 0,84*
	84	1,25 ± 0,27	2,61 ± 0,33*	2,63 ± 0,33*
	95	1,57 ± 0,35	2,50 ± 0,61	2,20 ± 0,10

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с ростом кандид на МПА.
Note. * $p < 0.05$ compared with *Candida* growth on nutrient agar.

гемолиза вокруг колоний кандид при их культивировании на кровяном агаре. Гемолитическая активность была характерна для всех исследуемых штаммов *C. auris* и отсутствовала у штаммов *C. albicans* (рис. 1). Липазная активность была обнаружена у всех исследуемых штаммов *C. auris*. Она оценивалась визуально и проявлялась наличием широких (2,5–3,0 см в диаметре) матовых ореолов вокруг колоний кандид на агаре, содержащем Твин-20. Подобного свойства не было обнаружено у штаммов *C. albicans* (рис. 1).

Протеолитическую активность микромицетов оценивали по их способности расщеплять белки, протеазную активность кандид — по наличию зоны гидролиза в агаре с казеином вокруг колоний. Для штаммов *C. auris* диаметр зоны гидролиза белка составлял 1–3 мм, в то время как вокруг колоний *C. albicans* отсутствовали видимые изменения субстрата. Во-вторых, определяли способность расщеплять молекулы IgG человека. Под действием метаболитов некоторых штаммов *C. auris* (70 и 84), по-видимому, повреждалась структура IgG (со стороны Fab-фрагмента), отвечающая за связывание с антигеном в тест-системе ИФА, что не было отмечено для *C. albicans* (рис. 2).

При оценке биоцидного эффекта кандид на буккальные эпителиоциты человека было установлено, что гибель мукозальных клеток отмечалась уже через 1 ч после их инкубации с метаболитами микромицетов и достигала максимальных значений к 3–4 ч (табл. 2). При этом кратность снижения жизнеспособности эпителиоцитов была более выражена в экспериментах с метаболитами *C. auris*, чем с *C. albicans* ($p < 0,05$). Продукты метаболизма некоторых штаммов *C. auris* могли снижать жизнеспособность эпителиальных клеток в $3,70 \pm 2,51$ раза, тогда как метаболиты *C. albicans* — не более чем в $1,92 \pm 0,25$ раза (табл. 2).

Обсуждение

Культивирование кандид на различных вариантах питательных сред показало, что размер колоний всех исследуемых штаммов *C. auris* на кровяном агаре был статистически значимо больше, чем у *C. albicans*. Таким образом, для *C. auris*, в отличие от *C. albicans*, присутствие гемоглобина в среде служило дополнительным ростовым фактором.

Возникновению и развитию инфекционного процесса способствует наличие у кандид набора факторов патогенности, способствующих адгезии, инвазии и устойчивости к факторам иммунитета. Патогенетический потенциал микроорганизмов зависит, прежде всего, от ферментов и прочих молекул агрессии, приводящих к разрушению различных тканей и клеток хозяина. Наши эксперименты показали более высокую способность к синтезу ферментов и токсинов, обладающих деструктивными свойствами, для всех исследуемых штаммов *C. auris* по сравнению с *C. albicans*. Выраженная гемолитическая активность штаммов *C. auris* свидетельствует о том, что данные микромицеты обладают высокой требовательностью к питательным средам и выраженной способностью к разрушению различных клеток человека, включая эритроциты. Известно, что гемолизины микроорганизмов обычно представлены порообразующими токсинами [10], которые взаимодействуют с мембранами клеток и повреждают их. Так, некоторые авторы [11, 12] связывают высокий уровень (до 60%) смертности при инвазивных инфекциях, вызванных *C. auris*, с секрецией данных видов гемолизин.

При исследовании действия метаболитов кандид на буккальные эпителиоциты человека выявлено, что биоцидная активность микромицетов не зависела от вида, а имела штамм-зависимый характер. Таким образом, наличие гемолитической активности, показанное нами для *C. auris*, не давало

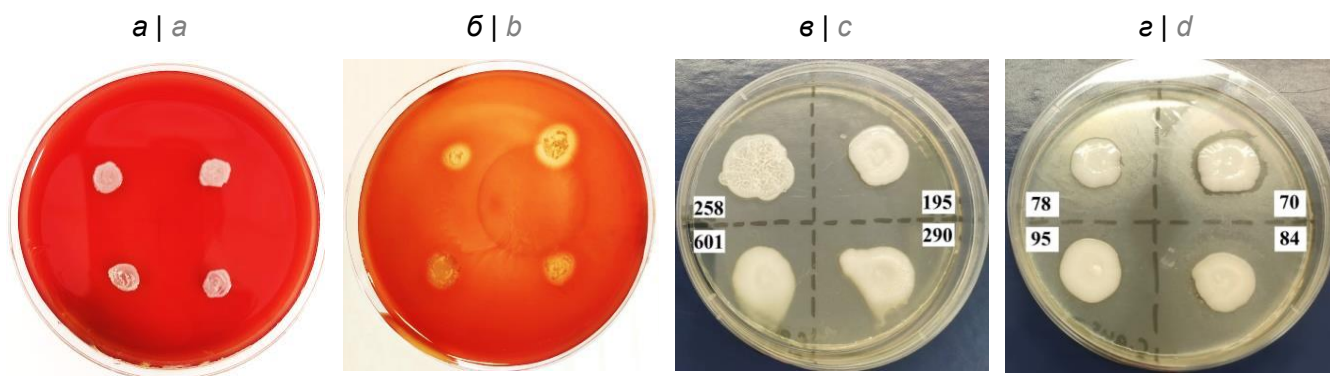


Рис. 1. Гемолитическая (а, б) и липазная (в, г) активность *C. albicans* и *C. auris*.

а — рост *C. albicans* на кровяном агаре — гемолиза нет; б — гемолиз вокруг колоний *C. auris* на кровяном агаре; в — рост *C. albicans* на агаре, содержащем Твин-20; г — матовые ореолы вокруг колоний *C. auris* на агаре, содержащем Твин-20.

Fig. 1. Hemolytic (a, b) and lipase (c, d) activity of *C. albicans* and *C. auris*.

а — *C. albicans* growth on blood agar without hemolysis; б — hemolysis around the colonies of *C. auris* on blood agar; в — *C. albicans* growth on Tween-20 agar; д — matte halos around the colonies of *C. auris* on Tween-20 agar.

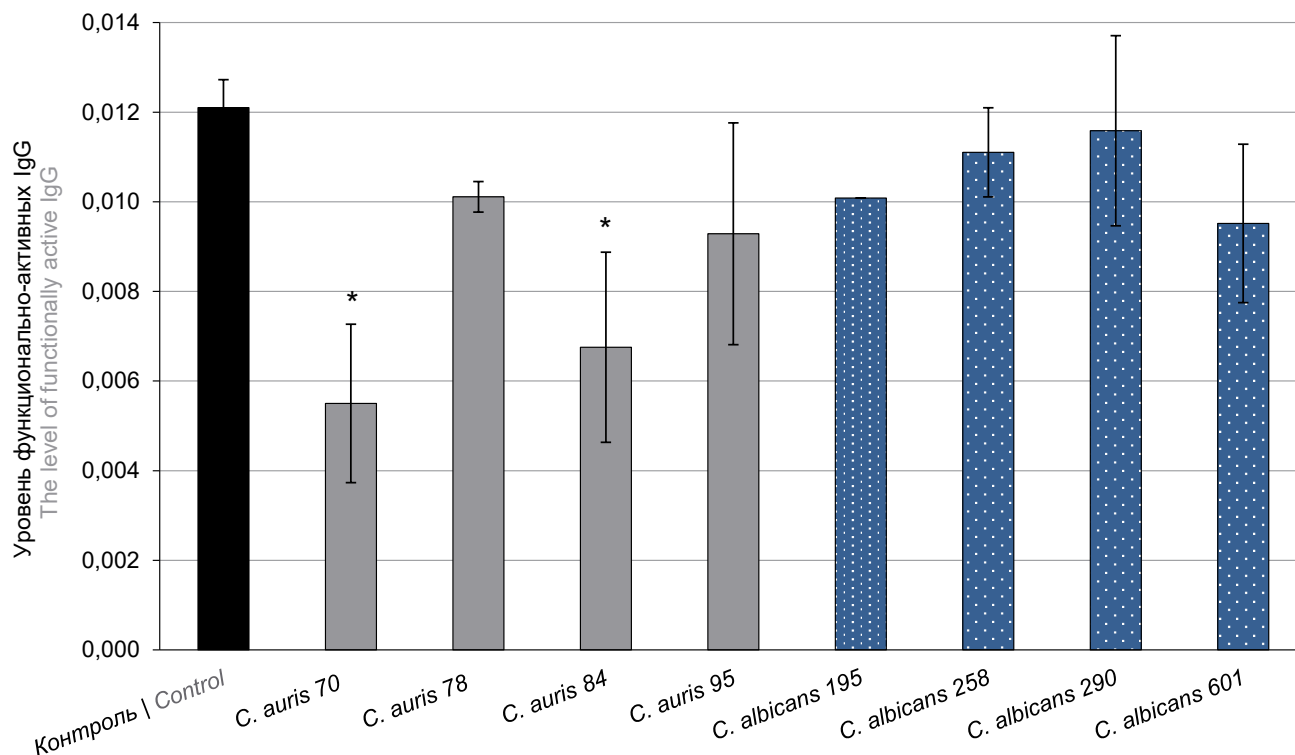


Рис. 2. Концентрация функционально активных IgG после часовой экспозиции с метаболитами кандид.
* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Fig. 2. Concentration of functionally active IgG after one-hour exposition with *Candida* metabolites.
* $p < 0.05$ compared to control.

им преимущество в преодолении защитного барьера мукозальных клеток. *C. auris* и *C. albicans* в равной мере повреждали буккальные эпителиоциты, что, по-видимому, было связано с продукцией иных биоцидных молекул.

Эксперименты также показали, что липазная активность была характерна только для исследуемых штаммов *C. auris*. Известно, что наличие липазы уве-

личивает инвазивные возможности микроорганизма, способствуя его проникновению с поверхности кожи в более глубокие слои [11, 12]. Кандиды способны продуцировать различные липазы, в частности, *C. albicans* синтезируют фосфолипазу В [2, 13]. Тем не менее наши эксперименты показали, что штаммы *C. auris* обладали более выраженной общей липазной активностью. Это может служить

Таблица 2. Изменение жизнеспособности буккальных эпителиоцитов после инкубации с метаболитами *C. auris* и *C. albicans*

Table 2. Changes of buccal epithelial cells viability after incubation with *C. auris* and *C. albicans* metabolites

Штаммы кандид — продуцентов метаболитов <i>Candida</i> strains — producers of metabolites	Кратность снижения количества живых клеток (количество раз) в зависимости от времени инкубации Rates of reduction in number of viable cells (in fold) depending on the incubation time			
	1 ч h	2 ч h	3 ч h	4 ч h
Контроль Control	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>C. auris</i> 70	1,63 ± 0,10*	1,76 ± 0,12*	2,18 ± 0,84*	1,97 ± 0,42*
<i>C. auris</i> 78	1,31 ± 0,19*	1,64 ± 0,19*	1,26 ± 0,04*	1,44 ± 0,01*
<i>C. auris</i> 84	1,42 ± 0,17	1,50 ± 0,21	2,15 ± 0,33*	3,70 ± 2,51
<i>C. auris</i> 95	1,17 ± 0,17	1,09 ± 0,09	1,61 ± 0,16*	1,59 ± 0,23*
<i>C. albicans</i> 195	1,19 ± 0,09	1,27 ± 0,16	1,92 ± 0,25*	1,86 ± 0,20*
<i>C. albicans</i> 258	1,06 ± 0,08	1,13 ± 0,14	1,30 ± 0,17	1,17 ± 0,24
<i>C. albicans</i> 290	1,25 ± 0,15*	1,14 ± 0,18	1,41 ± 0,31	1,14 ± 0,35
<i>C. albicans</i> 601	1,24 ± 0,09*	1,44 ± 0,11*	1,15 ± 0,22	0,60 ± 0,06*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем — буккальными эпителиоцитами в стерильном бульоне Сабуро.
Note. * $p < 0.05$ compared to the control — buccal epithelial cells in sterile Sabouraud broth.

дополнительным объяснением более сильной проникающей способности *C. auris* по сравнению с *C. albicans*.

Продукция микроорганизмами протеаз способствует разрушению межклеточных контактов и протеинсодержащих молекул иммунитета. Протеолитическая активность характерна как для *C. auris* [11], так и для *C. albicans* [7]. В нашей работе оценена способность кандид гидролизовать высокомолекулярные белки. Данная активность отмечена только у штаммов *C. auris*. Разрушение в эксперименте сложносоставной белковой молекулы, такой как казеин, может указывать на то, что *C. auris* способна к расщеплению белковых компонентов межклеточного матрикса. В пользу этого предположения свидетельствуют данные других экспериментов, показывающих, что метаболиты данного микромицета, в отличие от *C. albicans*, разрушают межклеточные связи в монослое фибробластов человека [9]. Значение подобных экстрацеллюлярных ферментов особенно важно для *C. auris* в связи с отсутствием гифообразования и возможности пенетрации тканей за счёт гиф [12, 13].

Метаболиты некоторых штаммов *C. auris* продемонстрировали способность к разрушению молекул IgG. Можно предположить, что наличие такой активности объясняется синтезом кандидами секреторных аспартилпротеиназ. Данные гидролазы отличаются широкой субстратной специфичностью, разрушая многие, в том числе участвующие в иммунном ответе белки: альбумин, коллаген, фибронектин, лактоферрин слюны, интерлейкин-1 β и др. [3]. Данное качество *C. auris* можно рассматривать как один из механизмов антииммунной стратегии, позволяющей данному виду снижать эффективность специфического гуморального звена иммунитета. Антиглобулиновая активность *C. auris* способствует диссеминации патогена в тканях, а также его стабилизации в циркуляторном русле на стадии кандидемии.

Все вышеуказанное свидетельствует в пользу того, что *C. auris* хорошо приспособлена к инвазивному типу инфекции.

Заключение

По данным литературы известно, что штаммы *C. albicans* могут проявлять гемолитическую активность [14]. Однако в наших исследованиях было установлено, что штаммы *C. auris* чаще проявляют данное качество, при этом демонстрируя более интенсивный рост колоний, чем на среде Сабуро, т.е. являются выраженными гемофильными микромицетами. В связи с этим можно заключить, что наиболее благоприятной средой для культивирования *C. auris* является кровяной агар, а не среда Сабуро. Эксперименты также показали, что общая протеолитическая и липазная активности были более вы-

ражены у штаммов *C. auris*, что указывало на их более высокий инвазивный потенциал по сравнению с *C. albicans*. Метаболиты некоторых штаммов *C. auris* были способны разрушать структуру молекул IgG, что можно рассматривать как дополнительный механизм антииммунной стратегии микромицетов. Бицидная активность в отношении букальных эпителиоцитов отмечалась у всех штаммов *C. auris* и *C. albicans*, при этом выраженность признака имела штамм-зависимый характер.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- de Jong A.W., Hagen F. Attack, defend and persist: how the fungal pathogen *Candida auris* was able to emerge globally in healthcare environments. *Mycopathologia*. 2019;184(3):353–65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00351-w>
- Mba I.E., Nweze E.I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;39(10):1797–819. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03912-w>
- Ilkhanizadeh-Qomi M., Nejatbakhsh S., Jahanshiri Z., Razzaghi-Abyaneh M. Aspartyl proteinase and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients. *Jundishapur J. Microbiol.* 2020;13(9):e105200. DOI: <https://doi.org/10.5812/jjm.105200>
- Kumamoto C.A., Gresnigt M.S., Hube B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Curr. Opin. Microbiol.* 2020;56:7–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.006>
- Ahmad S., Alfouzan W. *Candida auris*: epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. *Microorganisms*. 2021;9(4):807. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040807>
- ОФС.1.7.2.0012.15. Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков. М.; 2015. OFS.1.7.2.0012.15. Production probiotic strains and strains for probiotic control. Moscow; 2015
- Лахтин М.В., Козлов Л.В., Лахтин В.М. и др. Защита потенциальных антител человека от протеолиза секретами клинических штаммов *Candida* в присутствии пробиотических бактериальных лектинов человека. *Астраханский медицинский журнал*. 2012;7(1):63–8. Lakhtin M.V., Kozlov L.V., Lakhtin V.M., et al. The protection of the human potential antibodies against proteolysis by the secrets of *Candida* clinical strains in the presence of the human probiotic bacterial lectins. *Astrakhan Medical Journal*. 2012;7(1):63–8. DOI: <https://doi.org/10.24412/FdxVKV2JAys>. EDN: <https://elibrary.ru/ozeywz>
- Воропаева Е.А., Байракова А.Л., Бичучер А.М. и др. Протеолитическая активность микрофлоры полости рта у больных пародонтитом. *Биомедицинская химия*. 2008;54(6):706–11. Voropaeva E.A., Bairakova A.L., Bichucher A.M., et al. Proteolytic activity of the oral microflora in patients with periodontitis. *Biomedical Chemistry*. 2008;54(6):706–11.
- Игнатова Н.И., Заславская М.И., Александрова Н.А. и др. Влияние метаболитов *Candida* spp. на фибробласты кожи человека. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(2):381–5. Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., et al. Impact of *Candida* spp. metabolites on human skin fibroblasts. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(2):381–5. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-IOC-1795>. EDN: <https://elibrary.ru/plgjav>
- Zhang X., Hu X., Rao X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. *Microbiol. Res.* 2017;205:19–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.006>

11. Larkin E., Hager C., Chandra J., et al. The emerging pathogen *Candida auris*: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017;61(5):e02396-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.02396-16>
12. Ahmad Khan M.S., Alshehrei F., Al-Ghamdi S.B., et al. Virulence and biofilms as promising targets in developing pathogenic drugs against candidiasis. *Future Sci. OA.* 2020;6(2):FSO440. DOI: <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0027>
13. Rossato L., Colombo A.L. *Candida auris*: what have we learned about its mechanisms of pathogenicity? *Front. Microbiol.* 2018;9:3081. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03081>
14. Rossoni R.D., Barbosa J.O., Vilela S.F., et al. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-albicans *Candida* species. *Braz. Oral Res.* 2013;27(6):484–9. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1806-83242013000600007>

Информация об авторах

Игнатова Надежда Ивановна[✉] — к.б.н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия, n.i.evteeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4570-9342>

Заславская Майя Исааковна — д.б.н., доцент, профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>

Александрова Наталья Александровна — к.б.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4845-8056>;

Лапшина Анна Александровна — магистр кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9072-9556>

Махрова Татьяна Владимировна — к.м.н., доцент, доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6469-8987>

Лукова Ольга Алексеевна — к.б.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7552-9994>

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

Статья поступила в редакцию 30.12.2022;
принята к публикации 01.03.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Nadezhda I. Ignatova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, n.i.evteeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4570-9342>

Maya I. Zaslavskaya — D. Sci. (Biol.), Docent, Professor, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>;

Natalya A. Alexandrova — Cand. Sci. (Biol.), senior lecturer, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4845-8056>;

Anna A. Lapshina — Master of Science, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9072-9556>

Tatyana V. Makhrova — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6469-8987>

Olga A. Lukova — Cand. Sci. (Biol.), senior lecturer, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7552-9994>

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

The article was submitted 30.12.2022;
accepted for publication 01.03.2023;
published 28.06.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-364>

Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification

Maria I. Pika, Olga O. Mikheeva, Elena D. Solovyova, Anna V. Valdokhina, Victoria P. Bulanenko, Evgeny A. Cherkashin, Vadim V. Petrov, Kirill V. Krasovitev, Anna S. Cherkashina[✉], Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* GIM1.543 (Bst DNA polymerase) possesses 5'-3' DNA polymerase activity, 5'-3' displacement activity and high processivity. These properties make it possible to use Bst DNA polymerase in loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which provides highly specific amplification of the target sequence and is used for rapid detection of agents causing human infectious diseases.

The **purpose** of the study was to produce a recombinant Bst polymerase enzyme in the bacterial expression system and to assess its properties for LAMP-based diagnostics of infectious diseases.

Materials and methods. Expression constructs carrying the Bst polymerase gene were obtained using genetic engineering techniques. Different *Escherichia coli* strains were used for protein expression. Metal-chelate and gel filtration chromatography techniques were used for protein purification. Catalytic characteristics of the enzyme were assessed in loop-mediated isothermal amplification reactions using AmpliSens[®] SARS-CoV-2-IT, AmpliSens[®] IAV-IT and AmpliSens[®] IBV-IT diagnostic systems designed for high-quality detection of SARS-CoV-2, influenza A virus (IAV) and influenza B virus (IBV) RNA, respectively.

Results. The offered protocol for production, extraction and purification of recombinant Bst polymerase makes it possible to produce the enzyme in the bacterial expression system using *E. coli* cells in a soluble form and reaching the yield up to 20% of the total cell mass. In LAMP reactions, the obtained enzyme demonstrates activity comparable with that of the commercial enzyme Bst 2.0 (NEB).

Conclusion. Considering the fast purification and production of the enzyme, the obtained recombinant Bst polymerase can be used in LAMP-based diagnostic kits.

Keywords: polymerase, isothermal amplification, recombinant enzyme

Funding source. The research was funded by the State budget (Federal project "Sanitary shield of the country — safety for health (prevention, detection, response)").

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

For citation: Pika M.I., Mikheeva O.O., Solovyova E.D., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., Cherkashin E.A., Petrov V.V., Krasovitev K.V., Cherkashina A.S., Akimkin V.G. Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(3):210–218.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-364>

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

Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации

Пика М.И., Михеева О.О., Соловьева Е.Д., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Черкашин Е.А., Петров В.В., Красовитов К.В., Черкашина А.С.✉, Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus* GIM1.543 (ДНК-полимераза Bst) обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, 5'-3'-вытесняющей активностью и высокой процессивностью. Благодаря этим свойствам ДНК-полимераза Bst используется в петлевой изотермической амплификации (LAMP), которая обеспечивает амплификацию целевой последовательности с высокой специфичностью и применяется для быстрого обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Цель работы — получение рекомбинантного фермента Bst-полимеразы в бактериальной системе экспрессии и оценка его свойств в условиях LAMP для диагностики инфекционных заболеваний.

Материалы и методы. Методами генетической инженерии получали экспрессионные конструкции, несущие ген Bst-полимеразы. Экспрессию белка проводили в различных штаммах клеток *Escherichia coli*. Для получения очищенных препаратов белка использовали методы металл-хелатной и гель-фильтрационной хроматографии. Оценка каталитических свойств фермента проводили в реакциях петлевой изотермической амплификации в диагностических системах «АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT», «АмплиСенс® IAV-IT» и «АмплиСенс® IBV-IT», предназначенных для качественного определения РНК SARS-CoV-2, вируса гриппа А (IAV) и вируса гриппа В (IBV) соответственно.

Результаты. Разработанный протокол наработки, выделения и очистки рекомбинантной Bst-полимеразы позволяет получать фермент в бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli* в растворимой форме с выходом до 20% от собранной клеточной массы. В реакциях LAMP полученный фермент демонстрирует активность, сопоставимую с коммерческим ферментом Bst 2.0 («NEB»).

Заключение. Полученная рекомбинантная Bst-полимераза, учитывая быстрый способ очистки и получения фермента, пригодна для применения в диагностических наборах на основе LAMP.

Ключевые слова: полимеразы, изотермическая амплификация, рекомбинантный фермент

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета (федеральный проект «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)»)

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

Для цитирования: Пика М.И., Михеева О.О., Соловьева Е.Д., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Черкашин Е.А., Петров В.В., Красовитов К.В., Черкашина А.С., Акимкин В.Г. Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):210–218.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-364> EDN: <https://www.elibrary.ru/phcmoq>

Introduction

Nucleic acid amplification methods are widely used for diagnostics of infectious diseases, for detection of single nucleotide substitutions in genotyping and for other clinical purposes. However, the conventional polymerase chain reaction (PCR) is a time-consuming process and requires expensive specialized equipment. The comparatively recent technique developed by Notomi et al. for rapid detection of nucleic acid bases is loop-mediated isothermal amplification (LAMP) demonstrating high sensitivity and specificity in amplification of the target DNA sequence at constant temperatures in any temperature-controlled equipment,

requiring no thermal cycles and speeding up the process [1–4]. The LAMP technique is widely used for detection of agents of infectious diseases of viral etiology such as SARS-CoV-2 [5], influenza viruses and respiratory syncytial virus [6], hepatitis C virus [7], dengue virus DENV [8], human immunodeficiency virus HIV [9], and Ebola virus EVD [10].

Bst polymerase has been extensively used in isothermal amplification and has played a key role in the development of rapid clinical diagnosis of viral infections. DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* [11] was first isolated in 1972 [12] and purified in 1982 [13]. The three-dimensional structure of the

enzyme led to the conclusion that DNA polymerase I is comprised of 3 distinct domains [14]. Domain I is responsible for 5'-3' exonuclease activity; domain II is responsible for 5'-3' DNA polymerase activity; domain III resembles domains responsible for 3'-5' exonuclease activity in other polymerases [14]. Domains II and III are located at the C terminus of DNA polymerase I and are referred to as the large fragment (LF) [15]. The full-length DNA polymerase I gene from *Geobacillus stearothermophilus* consists of 2,628 base pairs and encodes a protein composed of 876 amino acids, with the weight of 98 kDa. The truncated Bst polymerase LF gene, which lacks the 5' terminus of 930 base pairs, encodes a protein of 587 aa, with weight of 64 kDa, and can be cloned with the C-terminal polyhistidine tag, with an estimated weight of 65 kDa. In this case, due to the presence of the hexahistidine tag at the C terminus of the gene, Bst polymerase lacks 5'-3' exonuclease activity and was demonstrated to be efficient in dNTP polymerization in PCR [16, 17]. In the meantime, there are works reporting cloning of Bst polymerase LF gene without a fusion tag to avoid misfolding of the recombinant protein [18].

Since Bst DNA polymerase has high processivity, polymerase and displacement activity, is able to remain active at 65°C [17] for a long time, and is widely used in isothermal amplification for rapid detection of infectious diseases, the **purpose** of this study is to offer an efficient method of production and purification of Bst polymerase suitable for diagnostic application in LAMP.

Materials and methods

The study was performed using NdeI and XhoI restriction endonucleases (Thermo Scientific), pET16b+ (Merck Millipore), *E. coli* strains XL2, ER2566, BL21 (DE3) pLys, Rosetta (DE3) (Merck Millipore); the growth media included bacto tryptone, bacto agar, and yeast extract (Helicon); for protein extraction – tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), NaCl, imidazole, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt, glycerol (Panreac); PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10–250 kDa (Thermo Scientific).

Obtaining a plasmid expression vector containing a Bst polymerase gene

Oligonucleotide primers were used for amplification of the gene encoding Bst polymerase: Bst-for 5'-GGTGGTCATATGCCGTCTTCTGAG-GAAGAAAAGCCGCTG-3'; Bst-rev 5'-GGTGGTTAACTCGAGTTTCGCTCAT-ACCAAGTAGAACCGTAGT-3', containing recognition sites of NdeI and XhoI restriction enzymes, respectively (underlined).

The resulting amplicons were treated with NdeI and XhoI restriction endonucleases and cloned into plasmid vector pET16b+, which was pretreated with the same restriction endonucleases. As a result, we

were able to construct the pET16-Bst-NHm4 expression vector. The correctness of the nucleotide sequence of the cloned gene was confirmed by sequencing.

Selection of *E. coli* strains for expression of the Bst-NHm4 gene

E. coli strains ER2566, BL21 (DE3) pLys, and Rosetta (DE3) were used as carrier strains for the constructed pET16-Bst-NHm4 vector. Transformed cells were seeded in the LB medium (1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) with agar containing 100 µg/ml of ampicillin for ER2566 cells and 20 µg/ml of chloramphenicol for BL21 (DE3) pLys and Rosetta (DE3) cells, and were grown for 14 hours at 37°C to obtain colonies. Then, several colonies were transferred to 100 ml of the LB medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin and grown for 16 hours at 37°C in a shaker at 180 rpm. The overnight culture of *E. coli* producer strains BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4, ER2566/pET16-Bst-NHm4 and Rosetta (DE3)/pET16-Bst-NHm4 was seeded in the LB medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin in Erlenmeyer flasks (the cell confluency was 2%) and grown at 37°C at 160 rpm. When the optical density reached 0.8 AU, isopropyl-β-D1-thiogalactopyranoside was added to a concentration of 0.4 mM and the culture was grown at 23°C and 37°C for 4 hours and 24 hours. The optical density was measured spectrophotometrically at a wavelength of 595 nm on a BioPhotometer Plus (Eppendorf). Cells were collected by centrifugation at 4,000 rpm for 20 min at 4°C using the Avanti JXN-30 centrifuge (Beckman Coulter).

Extraction of Bst-NHm4

The cell pellets (2 g) of the *E. coli* producer strain BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4 were resuspended in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 with 1 mM PMSF at a ratio of 1:10 (w/v) and lysed by sonication using the Branson sonifier 250 (Branson Ultrasonics) for 20 min at 4°C (the cycle – 0.5 sec, the amplitude – 50%). Then, they were centrifuged at 8,000 rpm for 30 min in the Allegra X-30R centrifuge (Beckman Coulter). After the centrifugation, the supernatant was diluted 2-fold with buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 (buffer A) and applied to the IMAC FF chromatography sorbent pre-equilibrated with the same buffer. Buffer A was used for removal of ballast proteins. The target protein was eluted with a linear gradient of buffer A with 500 mM imidazole.

Following the metal-chelate chromatography, the eluate was applied to the HiTrap column containing 5 ml of G-25 sorbent in buffer of 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, pH 8.5.

Assessment of Bst-NHm4 activity

To assess the activity of the Bst polymerase obtained in LAMP, we used reagents of the AmpliSens®

SARS-CoV-2-IT kit (RU No. RZN 2021/14599); plasmid DNA containing the target fragment of the SARS-CoV-2 genome was used as a sample. The reaction mixture in a volume of 10 μ l contained 5 μ l of SARS-CoV-2 IT-mix, 4.2 μ l of glycerol, thioglycerol, and fluorescent intercalating dye mixture, and 0.8 μ l of tested Bst polymerase. Bst 2.0 DNA Polymerase enzyme (NEB; hereinafter referred to as Bst 2.0) was used as a reference enzyme; the reaction mixture contained 5 μ l of IT-mix SARS-CoV-2, 4 μ l of glycerol, thioglycerol, and fluorescent intercalating dye mixture, and 1 μ l of Bst 2.0 polymerase. The prepared reaction mixtures were supplemented with 10 μ l of plasmid DNA (at a concentration of 10^4 and 10^6 copies/ml). Each sample was represented in 2 repeats. The reaction was performed in the CFX 96 thermocycler (Bio-Rad Laboratories). The amplification program consisted of 50 cycles lasting 30 sec at 65°C for 25 min with signal detection in the FAM channel.

Analytical methods

The protein concentration was measured using Qubit™ (Thermo Scientific); the purity of a protein was estimated using denaturing SDS-PAGE electrophoresis [19].

Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

To assess the possibility of using the received Bst polymerase in diagnostic testing systems, we performed real-time reverse transcription LAMP using reagents from AmpliSens® SARS-CoV-2-IT, AmpliSens® IAV-IT, and AmpliSens® IBV-IT kits designed for qualitative detection of SARS-CoV-2, IAV, and IBV RNA, respectively. Samples were represented by dilutions of viral RNA specimens from biological materials (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) at a concentration of 10^4 – 10^7 copies/ml.

The reaction mixture in a volume of 10 μ l contained 5 μ l of the pathogen-specific reagent of IT-mix, 4.2 μ l of glycerol, thioglycerol, and fluorescent intercalating dye mixture, and 0.8 μ l of Bst polymerase. The reference enzyme was represented by Bst 2.0 polymerase diluted to the concentration identical to that of the tested enzyme, 320 U/ml (1 unit of the enzyme catalyzes the incorporation of 25 nmol of dNTP into the product in 30 min at 65°C). The reaction mixtures were supplemented with 10 μ l of RNA. The reaction was performed in the DTprime thermocycler (DNA-Technology). The amplification program included preliminary incubation for 5 min at 37°C and isothermal amplification for 25 min (50 cycles) at 65°C with detection of a fluorescent signal every 30 sec in the FAM channel.

Licensed PCR-based reagent kits, AmpliSens® COVID-19-FL (RU No. RZN 2021/14599) and AmpliSens® Influenza virus A/B-FL (RU No. FSR 2009/05010) manufactured by the Central Research

Institute of Epidemiology were used for the reference analysis of RNA samples.

Results

The unique synthetic sequence of the *Bst-pol* gene was developed to produce recombinant Bst polymerase. For this purpose, we initially performed reverse translation of the fragment of the amino acid sequence of DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* (AAB52611) from 290 to 876 aa. Then, we optimized the nucleotide composition of the sequence with consideration for the frequency of codon occurrence for the bacterial expression system based on *E. coli* cells. The final gene sequence was obtained by assembly of long overlapping primers [20]. The gene encoding Bst-pol was cloned into the plasmid vector pET16b+ for prokaryotic expression in *E. coli*. During the selection of carrier strains for expression of the *Bst-NHm4* gene, we analyzed the changes in accumulation of the Bst-NHm4 enzyme at different temperatures (23°C and 37°C) and depending on the protein biosynthesis induction time (4 and 24 hours). Generally, the protein was effectively produced in *E. coli* carrier strains BL21 (DE3) pLys and Rosetta (DE3) in a soluble form; however, it was not produced in the carrier strain ER2566. Slightly higher biomass yields were achieved when the producer strain BL21 (DE3)pLys/ pET16- Bst-NHm4 was cultured at 23°C for 4 hours (Table 1).

During the first stage, metal-chelate affinity chromatography with an imidazole gradient was used to purify the enzyme from cellular proteins (Fig. 1). Fractions having purity of more than 90% (Fig. 2) were pooled and gel-filtration chromatography was performed. The resulting Bst-NHm4 enzyme was characterized using SDS-PAGE electrophoresis. The electrophoretic analysis showed that the purity of the enzyme was at least 95% (Fig. 3) at a concentration of 0.85 mg/ml.

The activity of the extracted Bst-NHm4 enzyme was verified by real-time LAMP using samples of plasmid DNA containing a fragment of the SARS-CoV-2 genome.

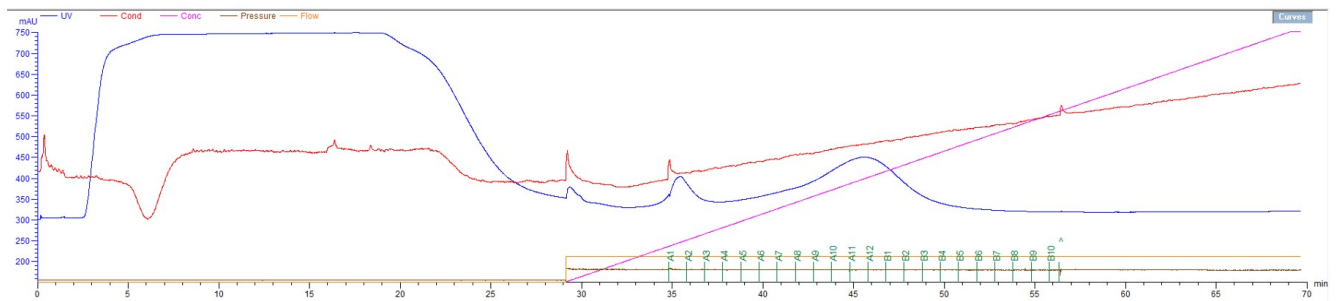
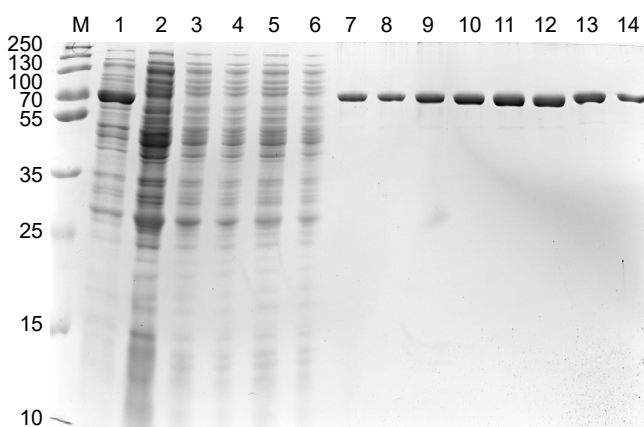
The test was performed using enzymes at a concentration of 320 U/ml. There were also two concentrations of DNA template: 10^2 and 10^4 copies (Table 2). Fig. 4 clearly shows that the produced Bst_NHm4 polymerase demonstrates higher activity (lower Ct values) in the LAMP reaction with DNA samples compared to the reference enzyme Bst 2.0.

The activity of the Bst-NHm4 enzyme was verified by the analysis of SARS-CoV-2, IAV, and IBV RNA samples isolated from biological material (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) using reverse transcription LAMP and reagents from AmpliSens® SARS-CoV-2-IT, AmpliSens® IAV-IT, and AmpliSens® IBV-IT kits compared to the Bst 2.0 enzyme. For control purposes, RNA samples were analyzed using reverse transcription PCR with AmpliSens® COVID-19-

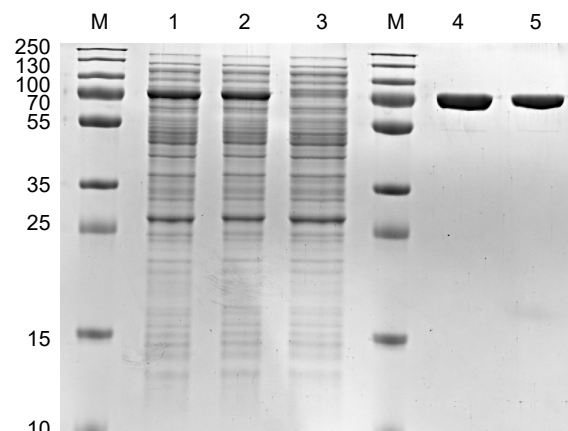
Table 1. Content of the Bst-NHm4 enzyme in producer strains compared to total cell protein

<i>E. coli</i> carrier strain	Culture conditions	Protein content, %	Cell biomass yield, g/L
ER2566	23°C, 4 h	Bst-NHm4 enzyme is not accumulated	
	23°C, 24 h		
	37°C, 4 h		
	37°C, 24 h		
BL21 (De3) pLys	23°C, 4 h	20,2	4,8
	23°C, 24 h	19,8	4,5
	37°C, 4 h	19,7	4,2
	37°C, 24 h	18,9	4,9
Rosetta (De3)	23°C, 4 h	19,5	5,1
	23°C, 24 h	19,3	4,9
	37°C, 4 h	18,8	4,5
	37°C, 24 h	18,7	4,7

Note. The data were obtained using the Image Lab v. 5.2.1 software (Bio-Rad).

**Fig. 1.** Chromatographic profile of purification of the recombinant Bst-NHm4 enzyme using IMAC FF sorbent.**Fig. 2.** Chromatographic purification of Bst-pol using IMAC FF sorbent.

M — molecular weight marker; 1 — clarified cell lysate of the producer strain BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4; 2 — ballast proteins; 3–14 — Bst-NHm4 fractions.

**Fig. 3.** Production and purification of Bst-NHm4.

M — molecular weight marker; 1 — total cell lysate; 2 — clarified cell lysate; 3 — cell sediment; 4 — total fraction of Bst-NHm4 after metal-chelate affinity chromatography; 5 — total fraction of Bst-NHm4 after gel-filtration chromatography.

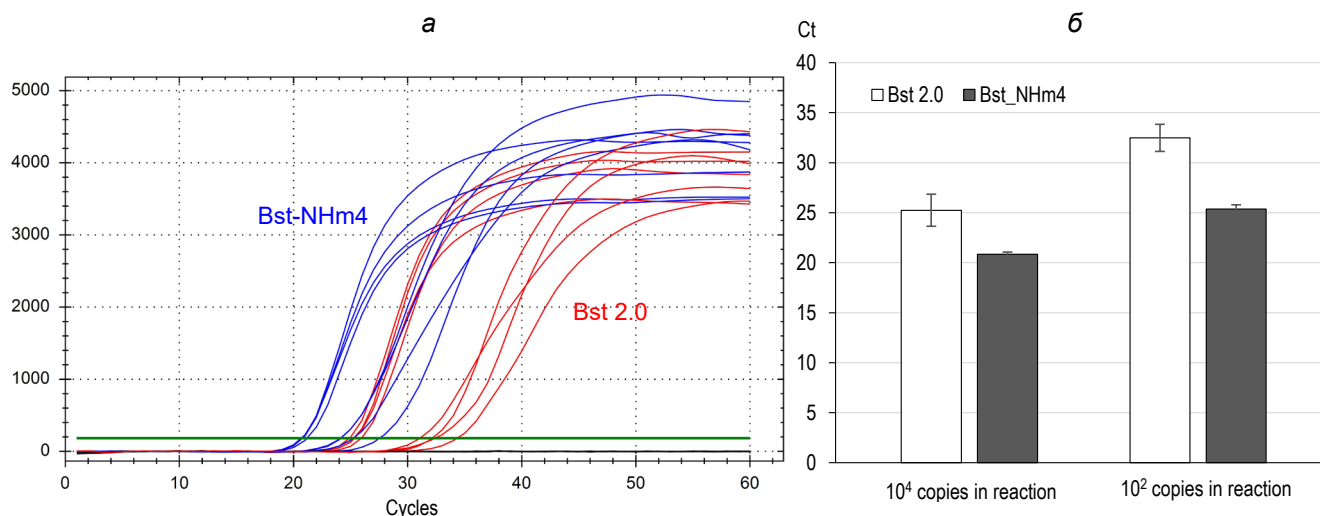


Fig. 4. Assessment of Bst-NHm4 polymerase activity in the model system.
 a — product accumulation curves; b — mean cycle threshold value.

FL reagent kit or PCR with AmpliSens[®] Influenza virus A/B-FL reagent kit and cDNA that had been obtained using REVERTA-L reagent kit.

The Bst_NHm4 polymerase demonstrates the activity comparable to that of the Bst 2.0 polymerase in

the LAMP reaction with SARS-CoV-2 RNA samples; however, its activity is lower (higher Ct values) with IAV and IBV RNA samples using respective reagent kits (**Fig. 5**). Despite the delay in passing of IBV RNA samples in reaction with the Bst-NHm4 polymerase

Table 2. Cycle threshold values using Bst-NHm4 in the LAMP reaction

Sample No.	Sample type	Bst polymerase	Ct values (FAM)
1	Control	Bst 2.0	—
2	Control	Bst-NHm4	—
Number of copies			
3	10 ²	Bst 2.0	30,1
4	10 ²	Bst 2.0	32,3
5	10 ²	Bst 2.0	31,0
6	10 ²	Bst 2.0	33,4
7	10 ²	Bst-NHm4	22,0
8	10 ²	Bst-NHm4	22,4
9	10 ²	Bst-NHm4	24,1
10	10 ²	Bst-NHm4	24,9
11	10 ⁴	Bst 2.0	22,2
12	10 ⁴	Bst 2.0	22,8
13	10 ⁴	Bst 2.0	24,0
14	10 ⁴	Bst 2.0	24,3
15	10 ⁴	Bst-NHm4	20,2
16	10 ⁴	Bst-NHm4	19,8
17	10 ⁴	Bst-NHm4	20,9
18	10 ⁴	Bst-NHm4	22,1

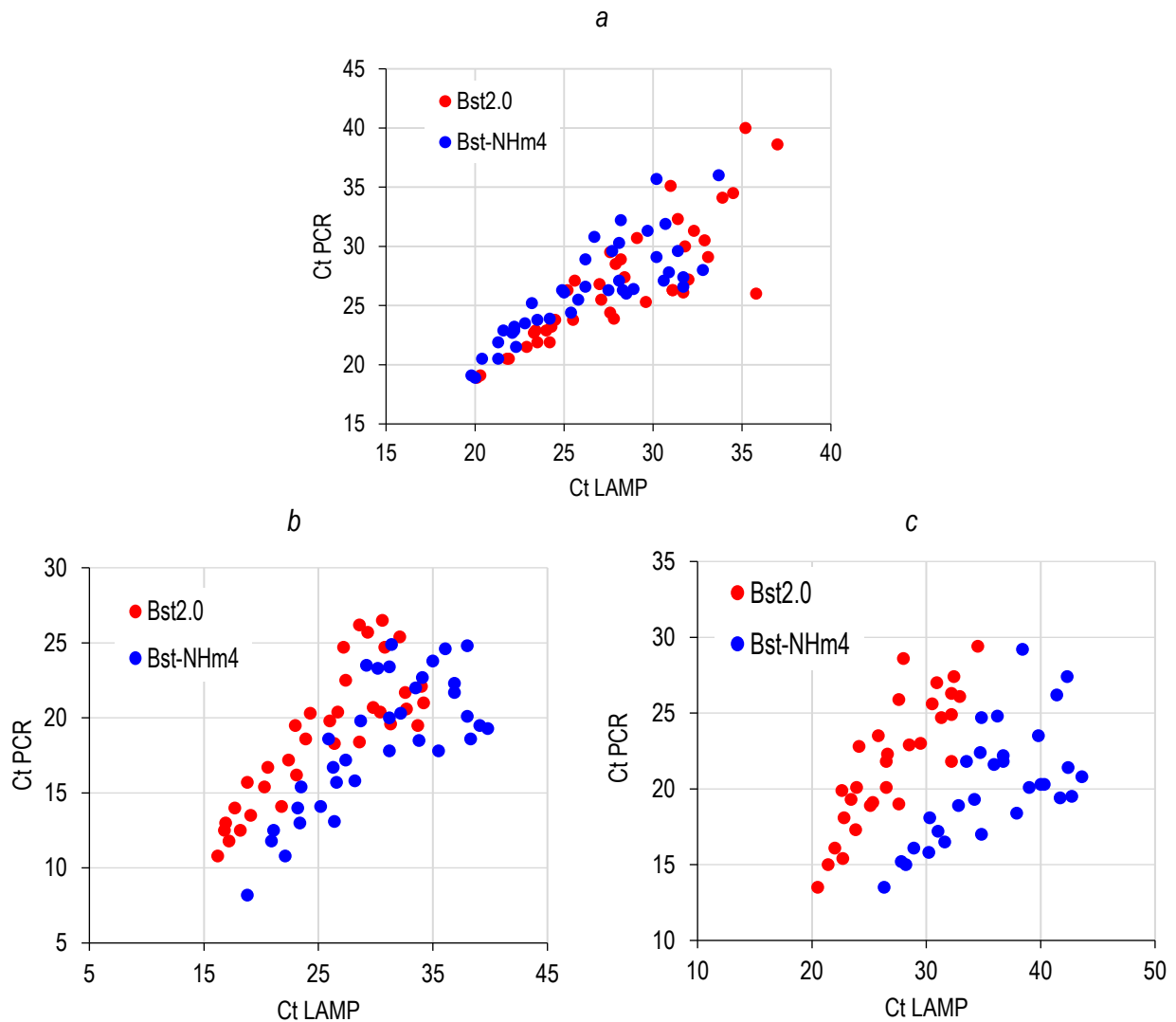


Fig. 5. Analysis of SARS-CoV-2 (a), IAV (b), and IBV (c) RNA samples isolated from biological material (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) using reverse transcription LAMP.

compared to Bst 2.0, the tested RNA samples were identified as positive, and it was sufficient for diagnostic systems with qualitative detection.

According to the user guides for AmpliSens[®] SARS-CoV-2-IT, AmpliSens[®] IAV-IT, and AmpliSens[®] IBV-IT reagent kits, they have a detection limit of max 10^4 copies/ml when used for RNA extraction from biological material with reagents from the RIBO-prep kit and high specificity provided by 4–6 diagnostic primers that are complementary to 6–8 regions of the target DNA.

The obtained results confirm that LAMP-based reagent kits have high diagnostic specificity (100%) compared to PCR test systems when used for analysis of RNA samples at a concentration of minimum 10^4 copies/ml. A major advantage of LAMP-based reagent kits is a significant reduction in the testing time (31 min) compared to PCR using AmpliSens[®] COVID-19-FL (103 min) and AmpliSens[®] Influenza virus

A/B-FL (150 min) reagent kits due to the shorter time required for the amplification program.

The findings demonstrate that the developed construct and the protocol for extraction and purification of Bst-NHm4 polymerase enzyme have promising prospects and need to be further studied to be used in new and existing reagent kits for LAMP-based diagnostics of different infections.

Conclusion

The offered protocol for extraction and purification of the enzyme provides an efficient method for obtaining recombinant Bst polymerase in a soluble form, with the protein yield reaching up to 19–20% of the total cell mass. Thus, considering the fast and efficient method of purification and production of the enzyme, Bst-NHm4 is suitable for further application in LAMP for diagnostic purposes.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):E63. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
2. Ostorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Mol. Biotechnol.* 2015;57(10):947–59. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x>
3. Becherer L., Borst N., Bakheit M., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods.* 2020;12(6):717–46. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
4. Soroka M., Wasowicz B., Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? *Cells.* 2021;10(8):1931. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
5. Moore K.J.M., Cahill J., Aidelberg G., et al. Loop-mediated isothermal amplification detection of SARS-CoV-2 and myriad other applications. *J. Biomol. Tech.* 2021;32(3):228–75. DOI: <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-017>
6. Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В. и др. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции. *Вопросы вирусологии.* 2021;66(6):417–424. Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitov K.V., et al. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology.* 2021;66(6):417–424. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>
7. Takayama I., Nakauchi M., Takahashi H., et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods.* 2019;267:53–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.02.010>
8. Wang Q.Q., Zhang J., Hu J.S., et al. Rapid detection of hepatitis C virus RNA by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011;63(1):144–7. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00828.x>
9. Parida M., Horioke K., Ishida H., et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(6):2895–903. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005>
10. Curtis K.A., Rudolph D.L., Owen S.M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods.* 2008;151(2):264–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.04.011>
11. Kurosaki Y., Takada A., Ebihara H., et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2007;141(1):78–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.031>
12. Wada K., Suzuki H. Biotechnological platforms of the moderate thermophiles, *Geobacillus* species: notable properties and genetic tools. In: Salwan R., Sharma V., eds. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles.* Academic Press; 2020:195–218. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03860-8>
13. Stenesh J., Roe B.A. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria: I. Purification and properties of DNA polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972;272:156–66. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(72\)90240-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90240-7)
14. Kaboev O.K., Luchkina L.A., Akhmedov A.T., Bekker M.L. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 1981;145(1):21–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.145.1.21-26.1981>
15. Steitz T.A. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1999;274(25):17395–8. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17395>
16. Phang S.M., Teo C.Y., Lo E., Wong V.W. Cloning and complete sequence of the DNA polymerase-encoding gene (Bstpoll1) and characterisation of the Klenow-like fragment from *Bacillus stearothermophilus*. *Gene.* 1995;163(1):65–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00387-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00387-1)
17. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993;2(4):275–87. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>
18. Li P., Amenov A., Kalendar R., et al. Cloning and purification of large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* and its application in isothermal DNA amplification. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* 2017;(1):50–8. DOI: <https://doi.org/10.11134/btp.1.2017.6>. EDN: <https://www.elibrary.ru/zbenmt>
19. Kordyukova M.Y., Antipova V.N., Rogachevsky V.V., Zyrina N.V. An acid precipitation technique: A strip assay for the large-scale DNA polymerase activity screening. *Anal. Biochem.* 2016;513:39–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.08.022>
20. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
21. Черкашина А.С., Пика М.И., Михеева О.О. и др. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Способ получения большого фрагмента Bst-полимеразы. Заявка на патент RU 2022135005. Заявл. 28.12.2022. Cherkashina A.S., Pika M.I., Mikheeva O.O., et al. CRIE. Method for obtaining a large fragment of Bst-polymerase. Patent application RU 2022135005; 28.12.2022.

Information about the authors

Maria I. Pika — junior researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3279-6811>

Olga O. Mikheeva — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1721-5134>

Elena D. Solovyova — junior researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0762-0347>

Anna V. Valdokhina — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4592-4755>

Victoria P. Bulanenko — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7055-1762>

Evgeny A. Cherkashin — Cand. Sci. (Chem.), Head, Center for development, product development and innovation — Deputy head, Production department, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3627-6047>

Vadim V. Petrov — Head, Research group of development of new molecular biological technologies, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3503-2366>

Kirill V. Krasovtsov — technologist-developer, Research group of development of new molecular biological technologies, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7237-1810>

Anna S. Cherkashina[✉] — Cand. Sci. (Chem.), Head, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, cherkashina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Author contribution. *Pika M.I.* — the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; *Mikheeva O.O.* — conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; *Solovyova E.D.* — conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data; *Valdokhina A.V.*, *Bulanenko V.P.* — conducting of the experiments; *Cherkashin E.A.*, *Petrov V.V.* — collection, analysis and interpretation of the data; *Krasovtsov K.V.* — the study concept and design, collection, analysis and interpretation of the data; *Cherkashina A.S.* — the study concept and design, preparing of the text; *Akimkin V.G.* — final approval of the article for publication. All authors made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 22.01.2023;
accepted for publication 20.03.2023;
published 28.06.2023

Информация об авторах

Пика Мария Игоревна — м.н.с., научная группа геномной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-3279-6811>

Михеева Ольга Олеговна — н.с., научная группа геномной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-1721-5134>

Соловьёва Елена Дмитриевна — м.н.с., научная группа геномной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-0762-0347>

Валдохина Анна Владимировна — н.с., научная группа геномной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-4592-4755>

Буланенко Виктория Петровна — н.с., научная группа геномной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0001-7055-1762>

Черкашин Евгений Александрович — канд. хим. наук, рук. центра разработки, развития продукции и инноваций — ВРИО заведующего научно-производственной лаборатории, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-3627-6047>

Петров Вадим Викторович — рук. научной группы разработки новых молекулярно-биологических технологий, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-3503-2366>

Красовитов Кирилл Владимирович — технолог-разработчик, научная группа разработки новых молекулярно-биологических технологий, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0001-7237-1810>

Черкашина Анна Сергеевна[✉] — к.хим.н., рук. научной группы геномной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, cherkashina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

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

Участие авторов. *Пика М.И.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Михеева О.О.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Соловьёва Е.Д.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; *Валдохина А.В.*, *Буланенко В.П.* — проведение экспериментов; *Черкашин Е.А.*, *Петров В.В.* — сбор, анализ и интерпретация данных; *Красовитов К.В.* — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных; *Черкашина А.С.* — концепция и дизайн исследования, подготовка текста; *Акимкин В.Г.* — концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации. Все авторы одобрили финальную версию статьи до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.01.2023;
принята к публикации 20.03.2023;
опубликована 28.06.2023



Применение иммуномагнитной сепарации для ускоренного обнаружения клеток *F. tularensis* в образцах почвы с помощью иммунохроматографического теста

Ветчинин С.С., Шевяков А.Г.[✉], Яковлева В.А., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболensk, Россия

Аннотация

Введение. Эпизоотологический мониторинг заражённости территории возбудителем туляремии предполагает сбор и исследование разнообразного полевого материала. Анализ таких объектов занимает длительное время и достаточно трудоёмок. В связи с этим существует потребность в разработке простых и быстрых диагностических методик, позволяющих проводить анализ образцов в условиях ограниченных ресурсов.

Цель работы — изучить возможность применения иммуномагнитной сепарации (ИМС) для ускоренной детекции клеток *Francisella tularensis* в образцах почвы с использованием иммунохроматографии.

Материалы и методы. Иммуномагнитные частицы получали на основе моноклональных антител к липополисахариду возбудителя туляремии. Для исследования использовали образцы почвы массой 1 г, в которые предварительно вносили инактивированные клетки *F. tularensis* 15/10. Образцы почвы перемешивали в экстрагирующем буфере, фильтровали и проводили сепарацию туляремиальных клеток с помощью суспензии иммуномагнитных частиц. Частицы отмывали, ресуспендировали в экстрагирующем буфере и прогревали при 100°C в течение 5 мин. Супернатант анализировали с помощью тест-полосок «ИХ-тест *F. tularensis*».

Результаты. Применение сочетания метода ИМС и иммунохроматографического теста для детекции клеток *F. tularensis* позволило обнаружить до 1×10^6 клеток возбудителя туляремии в исследуемых образцах почвы, в то время как в пробах почвы без ИМС выявлено 1×10^7 клеток.

Выводы. Разработана методика, основанная на использовании ИМС и иммунохроматографического теста, открывающая перспективы ускоренной диагностики заражённости образцов почвы в очаге туляремиальной инфекции. Время проведения анализа — около 3 ч. Чувствительность определения возбудителя — 1×10^6 микробных клеток в 1 г образца почвы. Методика проста, не требует сложного, дорогостоящего оборудования и может быть легко адаптирована для тестирования образцов другого происхождения (вода, зерно и др.). Полученные в процессе сепарации бактериальные клетки могут быть переданы для детекции *F. tularensis* другими методами.

Ключевые слова: *F. tularensis*, ИХ-тестирование, иммуномагнитная сепарация

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Яковлева В.А., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф. Применение иммуномагнитной сепарации для ускоренного обнаружения клеток *F. tularensis* в образцах почвы с помощью иммунохроматографического теста. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):219–224. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-348>
EDN: <https://www.elibrary.ru/pisplo>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-348>

Application of immunomagnetic separation for accelerated detection of *F. tularensis* cells in soil samples using an immunochromatographic test

Sergey S. Vetchinin, Anton G. Sheviakov[✉], Vera A. Yakovleva, Raisa I. Mironova, Sergey F. Biketov

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Abstract

Introduction. Epizootological monitoring of the area contamination with the causative agent of tularemia implies the collection and analysis of a variety of field specimens. The analysis of such objects is time- and labour-consuming. In this context, simple and fast diagnostic techniques are needed to analyze specimens under resource-limited conditions.

Aim. To study the possibility of using immunomagnetic separation for accelerated detection of *Francisella tularensis* cells in soil samples using immunochromatography.

Materials and methods. Immunomagnetic particles (IMPs) were produced by using monoclonal antibodies to lipopolysaccharide (LPS) of the tularemia causative agent. Soil specimens weighing 1 g with preliminary introduced inactivated *F. tularensis* 15/10 cells were used in the study. The samples were suspended in an extraction buffer (EB) and filtered. Tularemia cells were separated by IMP suspension. The particles were washed, resuspended in EB and heated at 100°C for 5 minutes. The supernatant was analyzed with test strips based on «*F. tularensis* IC-test kit».

Results. A combination of the immunomagnetic separation method and the IC test to detect *F. tularensis* cells identified up to 1×10^6 cells of the tularemia pathogen in analyzed soil samples, while 1×10^7 cells were detected in soil washouts in the absence of immunomagnetic separation.

Conclusion. The developed technique combining immunomagnetic separation and IC tests opens up prospects for express diagnostics of soil sample contamination in tularemia foci. The analysis takes about 3 hours, and its sensitivity is 1×10^6 cells/g of soil. The technique is simple, not requiring sophisticated expensive equipment. It can be easily adapted for testing other specimen types (water, grain, etc.). In addition, separated bacterial cells can be used for *F. tularensis* detection by other methods.

Keywords: *F. tularensis*, lateral flow immunochromatographic analysis, immunomagnetic separation

Funding source. This study was supported by Industry program of Rosпотребнадзор.

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

For citation: Vetchinin S.S., Sheviakov A.G., Yakovleva A.V., Mironova R.I., Biketov S.F. Application of immunomagnetic separation for accelerated detection of *F. tularensis* cells in soil samples using an immunochromatographic test. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023; 100(3):219–224.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-348> EDN: <https://www.elibrary.ru/pisplo>

Введение

Туляремия — зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая бактерией *Francisella tularensis*. Заболевание характеризуется симптомами общей интоксикации, лихорадкой, воспалительными изменениями в области ворот инфекции, регионарным лимфаденитом, склонностью к затяжному течению. Основными резервуарами и источниками возбудителя туляремии в естественных условиях являются дикие птицы и животные (около 50 видов), вода и гидробионты [1]. На территории природных очагов туляремии могут заражаться овцы, свиньи, крупный рогатый скот. Переносчиками инфекции являются клещи, комары, слепни, блохи. Согласно классификации, возбудитель *F. tularensis* входит во

II группу патогенных бактерий (опасных для человека) и относится к наиболее опасным микроорганизмам категории А, способным вызывать массовые заболевания людей (эпидемические вспышки). В связи с этим требуется постоянный мониторинг природных очагов туляремии с применением различных методов контроля.

Детекцию туляремийного антигена согласно МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» проводят для определения эпизоотии (текущей или прошлой) на исследуемой территории. Инфицирование туляремией происходит при вдыхании пылевого аэрозоля, содержащего живые туляремийные клетки. Пылевой аэрозоль образуется из частиц земли в ходе сельскохозяйственных ра-

бот и производства продуктов питания. Заражение почвы туляремийными клетками происходит через помёт хищных птиц, грызунов. Мониторинг объектов внешней среды — один из эффективных способов обнаружить возбудителя туляремии благодаря его устойчивости. Для исследования образцов окружающей среды отбирают погадки и помёт хищных птиц, кровососущих насекомых (после гомогенизации и экстрагирования), пробы воды и ила из водоёмов, гнёзда вместе с почвой и другие объекты, загрязнённые выделениями грызунов. Исследование образцов, представляющих собой сложные матрицы (например, почва), методами иммунодиагностики требует извлечения бактериальных клеток из смеси с другими микроорганизмами и компонентами субстрата, затрудняющими проведение анализа.

В состав перечня диагностических тест-систем для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней санитарной службы РФ утверждён набор реагентов для иммунохроматографического (ИХ) экспресс-теста для выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ-тест *F. tularensis*» (ФСР 2009/05486, ТУ 9398-092-78095326-2000¹). ИХ-тест разработан на основе высокоспецифичных моноклональных антител (МКА) [2]. В частности, применение этой ИХ-тест-системы для экспресс-выявления туляремийного микроба при проведении мониторинга природных очагов Северного Кавказа показало её высокую специфичность. У всех 69 штаммов *F. tularensis*, выделенных из клещей, наблюдали формирование полосы в тестовой зоне. Чувствительность составила 1×10^7 микробных клеток/мл [3].

В качестве одного из подходов для увеличения чувствительности диагностики инфекционных агентов и их маркеров в исследуемых образцах может использоваться этап концентрирования с применением иммуномагнитных частиц (ИМЧ), в частности, в таких методах диагностики, как иммуноферментный анализ [4–7], иммунохроматография [8], изотермическая амплификация [9], полимеразная цепная реакция [10].

Цель настоящей работы — изучить возможность применения иммуномагнитной сепарации для ускоренной детекции клеток *F. tularensis* в образцах почвы с использованием ИХ.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

Вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15/10 НИИЭГ (штамм В-4341) был получен из

Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ.

Условия культивирования

Культивирование и инактивацию штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15/10 НИИЭГ проводили по описанной ранее методике [11] в соответствии с санитарными правилами².

Наработка моноклональных антител к возбудителю туляремии

Для наработки МКА к липополисахариду *F. tularensis* гибридому 3F5 [11] выращивали *in vitro* в культуральных флаконах Т-75 («ТРП») на среде RPMI-1640 («Gibco») с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («HyClone») при 37°C и 5% CO₂. После 4–6 сут роста культуральную жидкость с клетками гибридом центрифугировали при 500g в течение 5 мин, осевшие клетки ресуспендировали в стерильном 0,9% растворе NaCl до концентрации 1×10^6 клеток/мл и вводили по 1,0 мл внутривенно мышам линии BALB/c.

Мышам за 21 сут внутривенно вводили 0,5 мл пристана («Sigma-Aldrich»). Через 7–10 сут после инъекции суспензии гибридом у мышей собирали асцитную жидкость, содержащую МКА. Клетки из асцитной жидкости удаляли центрифугированием при 1000g в течение 15 мин. Супернатант смешивали в соотношении 1 : 4 с 0,1 М фосфатным буферным раствором pH 8,6, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («ТРП»).

МКА очищали с помощью аффинной хроматографии на хроматографической колонке с белок А-сефарозой «MabSelectA» («Cytiva»). Колонку предварительно уравнивали фосфатным буферным раствором, затем пропускали разведение асцита со скоростью 0,5 мл/мин. Связавшиеся иммуноглобулины элюировали 0,1 М натрий-цитратным буферным раствором pH 3,0 и гель-фильтрационной хроматографией на колонке с сефадекса G-25 («Cytiva») переводили в фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) pH 7,4. Концентрацию полученных иммуноглобулинов определяли на спектрофотометре «DS-11» («DeNovix»).

Получение иммуномагнитных частиц

Для получения ИМЧ с МКА 3F5 использовали карбоксилированные магнитные частицы («Mag-Sphere»). Карбоксильные группы активировали

¹ Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания МУК 4.2.2939–11. М.; 2012. 59 с.

² Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 (ред. от 25.05.2022) «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней"».

карбодиимидным методом с использованием 10 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и 20 мМ N-гидроксисукцинимид («Sigma») в 0,1 М морфолиноэтансульфоновом буферном растворе pH 5,0 с 0,05% Твин-20 (MEST). Активацию магнитных частиц проводили при комнатной температуре с постоянным перемешиванием в течение 40 мин. После промывки на магнитном штативе к частицам добавляли раствор МКА 3F5 в MEST. Конъюгирование проводили в течение 90 мин при постоянном перемешивании. Оставшиеся реакционно-способные группы частиц инактивировали добавлением 1% раствора альбумина. Готовую суспензию ИМЧ промывали и переводили в ФСБ с 0,1% Triton X-100 и 0,01% азида натрия (ФСБ-Т).

Подбор оптимальных условий иммуномагнитной сепарации

В ФСБ-Т готовили суспензии инактивированных клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15/10 с концентрациями 1×10^5 – 1×10^8 микробных клеток в 10 мл. В суспензии микробных клеток вносили по 10 или 20 мкл 2,5% суспензии ИМЧ. Время инкубирования для каждой концентрации микробных клеток и ИМЧ составляло 30 и 60 мин. После инкубирования ИМЧ осаждали в магнитном штативе. Далее частицы ресуспендировали в 100 мкл 0,1 М цитратного буферного раствора pH 3,0 или ФСБ-Т и прогревали при 100°C в течение 5 мин. Затем частицы осаждали на магнитном штативе, полученный супернатант анализировали в ИХ-тесте, для цитратного буферного раствора предварительно доводили pH до 7,0. В качестве отрицательного контроля использовали образцы до инкубации с ИМЧ.

Пробоподготовка образца почвы

Для исследования использовали суглинистую почву, имитирующую образец гнезда грызунов, контаминированного туляремиными бактериями. В навески почвы массой 1 г добавляли по 100 мкл инактивированных мертиолятом натрия клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15/10 в количестве 1×10^5 – 1×10^8 микробных клеток и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Экстрагирование микробных клеток проводили двумя буферными растворами: ЭБ1 — ФСБ с добавлением 0,05% Твин-20, ЭБ2 — 50 мМ фосфатный буферный раствор pH 7,4 с 0,5 М хлорида натрия и 1% Triton X-100. Образцы почвы перемешивали в течение 30 мин с 9 мл каждого экстрагирующего буфера, отстаивали в течение 10 мин, супернатант фильтровали последовательно через ватный тампон и фильтровальную бумагу, предварительно смоченные ЭБ1/ЭБ2. Конечный объем фильтратов доводили до 10 мл, промывая фильтры. К полученному фильтрату добавляли 20 мкл 0,25% суспензии ИМЧ и инкубировали с перемешиванием в течение 30 мин.

Постановка ИХ-теста

Для постановки ИХ-теста использовали тесты в формате дипстик на основе «ИХ-тест *F. tularensis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Тест-полоски помещали в лунки 96-луночного планшета, содержащие по 100 мкл исследуемых образцов. Тестирование проводили в 5 повторах для каждой концентрации микробных клеток. Результат оценивали через 15 мин визуально.

Результаты

Исследование перспектив использования ИХ-теста в полевых условиях на примере модельной тест-системы для анализа образцов почвы, контаминированных клетками *F. tularensis*, заключается в решении следующих задач: конъюгирование магнитных частиц с МКА и подбор оптимального количества ИМЧ для сепарации, условия экстракции клеток *F. tularensis* из образцов почвы, снятия бактериальных клеток с ИМЧ после сепарации.

Магнитные частицы со свободными карбоксильными группами конъюгировали с МКА к липополисахариду *F. tularensis* 3F5 карбодиимидным методом. Для полученных ИМЧ оптимальное их количество составило 20 мкл 0,25% суспензии при сепарации клеток из 10 мл фильтрата и оптимальном времени инкубации 30 мин. Увеличение времени инкубирования образцов с ИМЧ до 60 мин не влияло на результаты ИХ-теста. Уменьшение количества ИМЧ до 10 мкл 2,5% суспензии снижало чувствительность при визуальной регистрации результатов ИХ-теста.

Проверка клеток после сепарации из фильтрата с использованием для экстракции буферного раствора ЭБ1 продемонстрировала появление фоновой реакции в виде коричневых полос в тестовой зоне как в опыте, так и в отрицательном контроле. Замена детергента Твин-20 на Triton X-100 и увеличение ионной силы буферного раствора в ЭБ2 привели к устранению неспецифической реакции в тестовой зоне (рис. 1).

Элюцию бактериальных клеток с ИМЧ после сепарации проводили в цитратном буферном растворе pH 3,0 или в ЭБ2 при 100°C. Оптимальное время полного снятия бактериальных клеток с магнитных частиц при кипячении в исследованных буферных растворах составляло 5 мин. Увеличение времени кипячения не влияло на чувствительность теста. Однако при элюции кислым буферным раствором необходимо доводить pH до нейтрального, что увеличивает время анализа. В связи с этим для дальнейшей работы выбрана методика прогрева в ЭБ2.

На рис. 2 представлены результаты ИХ-теста образцов почвы с различным содержанием клеток *F. tularensis*. Предел обнаружения при визуальном анализе для ИХ-теста после иммуномагнитной се-

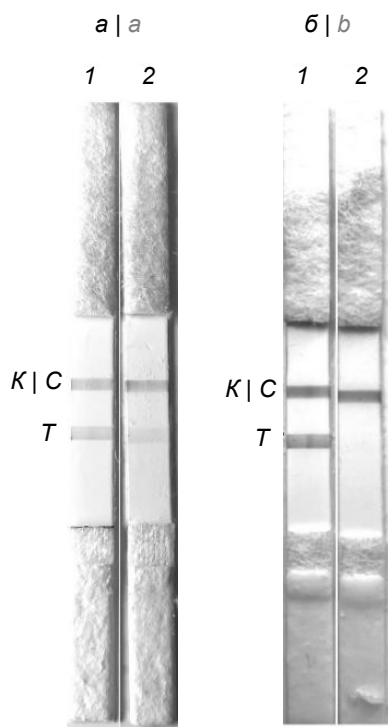


Рис. 1. Результаты ИХ-тестирования после иммуномагнитной сепарации клеток *F. tularensis* из образцов почвы в ЭБ1 (а) и ЭБ2 (б).

1 — 1×10^7 клеток на 1 г почвы; 2 — отрицательный контроль;
К — контрольная зона; Т — тестовая зона.

Fig. 1. The results of IC test after immunomagnetic separation of *F. tularensis* cells from soil samples in EB1 (a) and EB2 (b).

1 — 1×10^7 microbial cells per 1 g of soil; 2 — negative control;
C — control zone; T — test zone.

парации составил 1×10^6 микробных клеток на 1 г образца почвы, в то время как в фильтрате до сепарации — 1×10^7 микробных клеток.

Обсуждение

На основе полученных результатов при исследовании образцов почвы, содержащей клетки *F. tularensis*, предложена методика комбинирования иммуномагнитной сепарации и ИХ-тестирования. Методика не требует сложного приборного обеспечения и позволяет проводить мониторинг возбудителя туляремии непосредственно в природном очаге. Время проведения анализа образцов не превышает 3 ч. Полученная при исследовании чувствительность определения возбудителя составляет 1×10^6 микробных клеток в 1 г образца почвы, что коррелирует с чувствительностью коммерческих [12] и модельных [13] ИХ-тест-систем, полученных на клетках возбудителя туляремии. Кроме того, полученные после сепарации ИМЧ с бактериальными клетками могут быть переданы для детекции *F. tularensis* другими методами, в частности иммуноферментным анализом и методом петлевой изотермической амплификации.

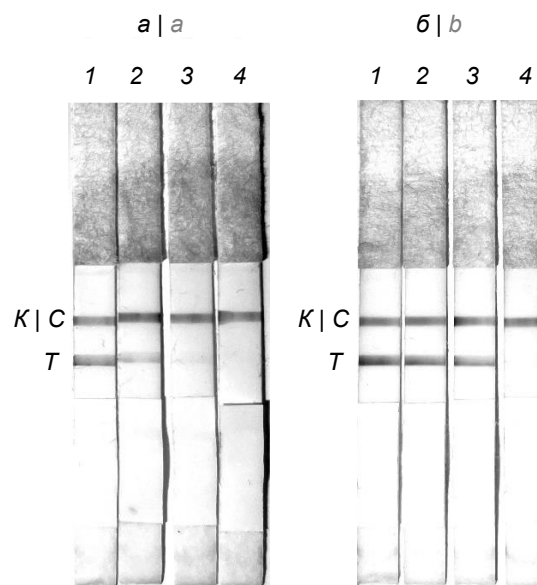


Рис. 2. Результат ИХ-тестирования фильтрата образцов почвы до (а) и после (б) иммуномагнитной сепарации клеток *F. tularensis*.

1 — 1×10^8 м.к.; 2 — 1×10^7 м.к.; 3 — 1×10^6 м.к.;
4 — 1×10^5 м.к. — количество микробных клеток в 1 г почвы;
К — контрольная зона; Т — тестовая зона.

Fig. 2. The result of IC test of the filtrate of soil samples before (a) and after (b) immunomagnetic separation of *F. tularensis* cells.

1 — 1×10^8 m.c.; 2 — 1×10^7 m.c.; 3 — 1×10^6 m.c.;
4 — 1×10^5 m.c. — the number of microbial cells in 1 g of soil;
C — control zone; T — test zone.

Заключение

Подобраны оптимальные условия использования иммуномагнитной сепарации для ускоренной диагностики *F. tularensis* в контаминированных образцах почвы с помощью ИХ-теста. Предлагаемая методика проста, не требует сложного дорогостоящего оборудования, может быть легко адаптирована для тестирования образцов различного происхождения (вода, зерно и т.д.) и, несомненно, окажется полезной при проведении эпизоотологического обследования природных очагов. Кроме того, методика может быть использована для определения липополисахарида в клинических образцах при диагностике заболевания туляремии [14].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes Infect.* 2019;8(1):1027–42. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1638734>
2. Хлебников В.С., Ветчинин С.С., Гречко Г.К. и др. Превентивная активность моноклональных антител, специфичных к липополисахариду туляремийного микроба. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1992;69(9-10):67–70. Khlebnikov V.S., Vetchinin S.S., Grechko G.K., et al. Preventive activity of monoclonal antibodies specific to tularemia microbe lipopolysaccharide. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 1992;69(9-10):67–70.

3. Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Царева Н.С. и др. Применение иммунохроматографических тест-систем для экспресс выявления липополисахарида *Francisella tularensis* при мониторинге природных очагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;(1):78–80. Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Tsareva N.S., et al. Immuno-chromatographic test system application for rapid detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in monitoring of natural foci. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;(1):78–80. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-78-80>. EDN: <https://www.elibrary.ru/pxfhfyz>
4. Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарников Т.В. и др. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(4):32–8. Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Zharnikov T.V., et al. Immuno-chromatographic test system application for rapid detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in monitoring of natural foci. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(4):32–8. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-32-38>. EDN: <https://www.elibrary.ru/nlmwbs>
5. Yazdankhah S.P., Sølverød L., Simonsen S., Olsen E. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk. *Vet. Microbiol.* 1999;67(2):113–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00035-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00035-8)
6. Mansfield L.P., Forsythe S.J. The detection of *Salmonella* using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000;31(4):279–83. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00811.x>
7. Wang Z., Yue T., Yuan Y., et al. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 2013;166(1):28–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.015>
8. Singh S., Upadhyay M., Sharma J., et al. A portable immunomagnetic cell capture system to accelerate culture diagnosis of bacterial infections. *Analyst*. 2016;141(11):3358–66. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6an00291a>
9. Kalendar R., Kaur A., Kapil A., et al. Highly-sensitive detection of *Salmonella typhi* in clinical blood samples by magnetic nanoparticle-based enrichment and in-situ measurement of isothermal amplification of nucleic acids. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194817. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194817>
10. Yang H., Qu L., Wimbrow A.N., et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2007;118(2):132–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.019>
11. Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Хомяков А.Е. и др. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител и иммуномагнитных частиц для детекции клеток *F. tularensis*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(6):353–7. Vetchinin S.S., Shevyakov A.G., Khomyakov A.E., et al. Development of an immunoassay test system based on monoclonal antibodies and immunomagnetic particles for the detection of *F. tularensis* cells. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021;66(6):353–7. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357>. EDN: <https://www.elibrary.ru/hzbnjk>
12. Ziegler I., Vollmar P., Knüpfer M., et al. Reevaluating limits of detection of 12 lateral flow immunoassays for the detection of *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, and *Bacillus anthracis* spores using viable risk group-3 strains. *J. Appl. Microbiol.* 2020; 130(4): 1173–80. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14863>
13. Wang R., Kim K., Choi N., et al. Highly sensitive detection of high-risk bacterial pathogens using SERS-based lateral flow assay strips. *Sens. Actuators B Chem.* 2018;270:72–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.162>
14. Hannah E.E., Pandit S.G., Hau D., et al. Development of immunoassays for detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in tularemia patient samples. *Pathogens*. 2021; 10(8):924. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10080924>

Информация об авторах

Ветчинин Сергей Сергеевич — к.б.н., в.н.с. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0002-6547-3365>

Шевяков Антон Георгиевич — н.с. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, shevyakov@obolensk.org, <https://www.orcid.org/0000-0002-0504-7073>

Яковлева Вера Александровна — м.н.с. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0002-6386-3829>

Миронова Раиса Ивановна — н.с. отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0001-8318-4156>

Бикетов Сергей Федорович — к.б.н., зав. отделом иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0003-1179-6895>

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

Статья поступила в редакцию 28.12.2022;
принята к публикации 18.06.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Sergey S. Vetchinin — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0002-6547-3365>

Anton G. Shevyakov — researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, shevyakov@obolensk.org, <https://www.orcid.org/0000-0002-0504-7073>

Vera A. Yakovleva — junior researcher, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0002-6386-3829>

Raisa I. Mironova — researcher, Department of especially dangerous infections, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0001-8318-4156>

Sergey F. Biketov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0003-1179-6895>

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

The article was submitted 28.12.2022;
accepted for publication 18.06.2023;
published 28.06.2023

REVIEWS

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-404>



Live attenuated COVID-19 vaccines: approaches to development and prospects for clinical use

Ekaterina R. Korchevaya¹✉, Anastasiia V. Gracheva¹, Ilya N. Dyakov¹, Vitaly V. Zverev¹, Evgeny B. Faizuloev^{1,2}

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

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract

Although WHO declared an end to the pandemic, COVID-19 remains a significant public health concern worldwide. Modern vaccines often induce either only humoral or only cellular immunity. Furthermore, new emergent epidemiologically significant SARS-CoV-2 variants and their spread considerably reduce the effectiveness of preventive vaccination. Therefore, there is an urgent need to improve the existing vaccines against COVID-19. One of the promising approaches to the solution of the problem is creation of a "universal" vaccine that would have a cross-protective activity against different antigenic variants of the virus. In this respect, the development of live attenuated vaccine is of special interest, as it can activate not only humoral, but also cell-mediated components of immunity, providing long-term immune response and cross-protection against different variants of the virus. This review highlights the existing approaches to producing attenuated SARS-CoV-2 strains and gives an assessment of their prospects for clinical use. Some researchers use methods of genetic engineering and reverse genetics such as site-directed mutagenesis and codon deoptimization for virus attenuation. Others tend to use traditional approaches focusing on producing virus mutants through extended passaging in cell culture under selective conditions. The gained experience demonstrates great prospects for development of highly effective live-attenuated vaccine against COVID-19.

Keywords: *live-attenuated vaccines, SARS-CoV-2, COVID-19, review*

Funding source. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-25-00146, <https://rscf.ru/project/23-25-00146/>

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

For citation: Korchevaya E.R., Gracheva A.V., Dyakov I.N., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Live attenuated COVID-19 vaccines: approaches to development and prospects for clinical use. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(3):225–236.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-404>

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

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-404>

Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения

Корчевая Е.Р.^{1✉}, Грачева А.В.¹, Дьяков И.Н.¹, Зверев В.В.¹, Файзулов Е.Б.^{1,2}¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Аннотация

Несмотря на объявленное ВОЗ завершение пандемии, COVID-19 остаётся актуальной проблемой здравоохранения во всём мире. Современные вакцины зачастую формируют либо только гуморальный, либо только клеточный иммунитет. Кроме того, появление и распространение новых эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2 значительно снижает эффективность вакцинопрофилактики. Всё это требует совершенствования существующих вакцин против COVID-19. Одним из возможных подходов к решению данной проблемы является создание «универсальной» вакцины, обладающей перекрёстной протективной активностью в отношении разных антигенных вариантов вируса. В связи с этим представляет интерес разработка живой аттенуированной вакцины, способной активировать не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета, обеспечивая продолжительный иммунный ответ и перекрёстную защиту от разных вариантов вируса.

В данном обзоре рассматриваются реализованные подходы к получению аттенуированных штаммов SARS-CoV-2 и оценивается потенциал их клинического применения. Одни авторы для аттенуации вируса используют методы геномной инженерии и обратной генетики, такие как сайт-направленный мутагенез и деоптимизация кодонов. Другие используют традиционный подход, направленный на получение мутантов вируса путём длительного пассирования в культуре клеток в селективных условиях. Накопленный на сегодняшний день опыт показывает большой потенциал создания высокоэффективной живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

Ключевые слова: живые аттенуированные вакцины, SARS-CoV-2, COVID-19, обзор

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-25-00146, <https://rscf.ru/project/23-25-00146/>

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

Для цитирования: Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Дьяков И.Н., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):225–236.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-404> EDN: <https://www.elibrary.ru/psdxzr>

Introduction

Although WHO declared an end to the pandemic, COVID-19 remains a significant public health concern worldwide. Efforts unprecedented by their scale are being taken to reduce the burden of this disease, including mass vaccination, development of new and "retargeting" of existing pharmaceutical products. Viral vector, mRNA, recombinant protein subunit vaccines and inactivated whole-virion vaccines have been developed worldwide and are used for specific COVID-19 prevention [1–5]. The application of these technology platforms shortens the time required for development of vaccines with high safety profile, helps prevent severe COVID-19 cases or fatal outcomes caused by a homologous variant of the virus (i.e. the virus variant, based on which the vaccine is developed). The emergence and wide spread of new epidemiologically sig-

nificant SARS-CoV-2 variants, especially the Omicron variant and its sublineages evading the immune protection developed against the Wuhan strain that was used in development of most of the approved vaccines, have considerably reduced the effectiveness of preventive vaccination [6–8]. Therefore, it is advisable to improve the existing vaccines and their match with the circulating SARS-CoV-2 variant to maintain the effectiveness of vaccination at high levels. One of the promising approaches to the solution of the problem is creation of a "universal" vaccine that would have a cross-protective activity against different antigenic variants of the virus. For example, good prospects are offered by the development of a live-attenuated vaccine (LAV) capable of activating not only humoral, but also cell-mediated components of immunity, providing long-term immune response and cross-protection against different variants

of the virus [9, 10]. It should be noted that currently the potential of LAVs in prevention of COVID-19 remains almost unrealized.

Currently approved LAVs are highly effective and are successfully used for specific prevention of such diseases as poliomyelitis, measles, rubella, chicken pox, mumps, and influenza [11]. These vaccines were developed by obtaining mutant forms of the virus, which have reduced ability to replicate in human cell culture [12, 13], or by creating cold-adapted (*ca*) temperature sensitive (*ts*) variants incapable of replication at human body temperature [14].

The **purpose** of this review is to highlight the existing approaches to SARS-CoV-2 attenuation and to assess the prospects for clinical use of LAVs against COVID-19.

Approaches to SARS-CoV-2 attenuation

Certain experience has been accumulated in producing attenuated SARS-CoV-2 strains. Some researchers use methods of genetic engineering and reverse genetics such as site-directed mutagenesis and codon deoptimization for virus attenuation [15–20]. Others tend to use traditional approaches focusing on producing virus mutants through extended passaging in cell culture under selective conditions [21–24]. Currently, the only LAV against COVID-19 - CoviLiv™ vaccine (previously called COVI-VAC; developers: Codagenix (United States) and the Serum Institute (India) is undergoing clinical trials; it is a virus with deoptimized codons in the S protein [5].

Classical (traditional) approaches to SARS-CoV-2 attenuation

One of the classical approaches to virus attenuation is virus adaptation to growth at low temperatures; usually, it is performed in cells of a different host. It was used for development of live vaccines against influenza, rubella, and measles [25–29], and such vaccines are widely used in different countries of the world. Cold adaptation is a process, by which the virus gradually adapts to growth in cell culture at low temperatures; it is often associated with reduced replication at 37°C and higher temperatures. The adaptation of the virus to a new host and to the growth at low temperatures results in development of mutant forms of the virus, which are characterized by decreased replicative activity in a human body. For example, the virus having *ca*- and *ts*-phenotypes is not able to replicate effectively and to cause pathological changes in the human body where the temperature is higher than 37°C (**Fig. 1**). The *ca*-phenotype represents the ability of the virus to replicate effectively in cell culture at low temperatures compared to the parent strain. The *ts*-phenotype is characterized by the inability of the virus to replicate at 37°C, 39°C or 41°C, while these temperatures are favorable for replication of the parent strain.

For illustrative purposes, we can refer to the existing analog vaccine against the respiratory virus, namely the live-attenuated influenza vaccine (LAIV), which is administered intranasally. LAIV induces development of not only systemic humoral and cell-mediated immunity, but also local mucosal immunity at the point of entry of the virus into the body (the "entrance gate" of infection) – the respiratory mucosa. LAIV is based on using the *ca*-strain – an attenuation donor bearing in "internal genes" mutations, which are responsible for the *ts*-phenotype of the virus (the ability to replicate at 25–33°C, but not at 37–39°C) [30]. "Internal genes" encode all proteins of the influenza virus except for surface antigens – hemagglutinin and neuraminidase. Thus, when administered intranasally, *ca/ts*-strains of the influenza virus affect the upper respiratory tract (this specifies their immunogenicity), but they are not able to replicate in lungs and cause pneumonia. Vaccine strains for LAIV are obtained by reassortment between the donor strain and circulating strains, following which reassortant strains carry "internal genes" responsible for their attenuation (*att*) phenotype as well as hemagglutinin and neuraminidase genes responsible for protective properties of the virus [29–31]. Drawing on the experience gained in the LAIV development, several groups of researchers are working on LAV against COVID-19.

For SARS-CoV-2 attenuation, in some studies, the virus was adapted to growth at low temperatures combined with change of the host [21, 22, 24, 32], while Li et al. achieved attenuation solely by changing the host [13]. The isolation and further cultivation of the virus were performed in monkey kidney cell culture (the Vero CCL-81 or Vero E6 cell line). To obtain *ca*-strains, the wild-type (parent) strain was passaged at the temperature gradually decreased to 21–23°C. When the desired temperature was reached, the *ca*-virus went through a few more passages at the low temperature to secure the phenotype and was cloned using the plaque method [24] or the limiting dilution method [21, 32]. The randomly selected *ca*-clones obtained during the previous stage were examined for the presence of the

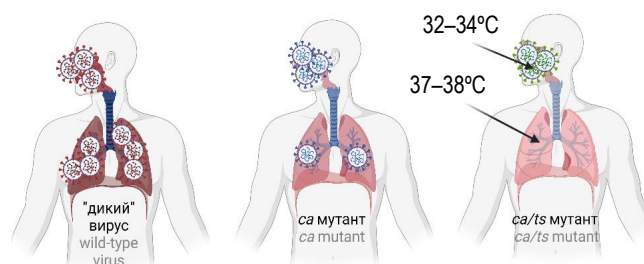


Fig. 1. Virulence of the wild-type, cold-adapted (*ca*) and temperature-sensitive (*ca/ts*) strains of the respiratory virus. The wild-type strain can affect the upper and lower respiratory tract, causing pneumonia, while the *ca*-strain primarily affects the upper compartments, and *ca/ts* affects only the upper compartments of the respiratory tract.

ts-phenotype [21, 24, 33], which, like the *ca*-phenotype, is a possible marker of the virus attenuation [14].

Seo et al. were the first to describe the development of the attenuated cold-adapted SARS-CoV-2 virus [21]. The clinical isolate of SARS-CoV-2 was attenuated by cold adaptation to 22°C; each passage was performed at a lower temperature if pronounced CPE was demonstrated. The obtained attenuated strain had both *ca*- and *ts*-phenotypes, which was associated with 59 mutations present in genes of structural and non-structural proteins, including 37 nonsynonymous substitutions. The K18-hACE2 transgenic mice expressing the gene of the human ACE2 receptor were immunized with the attenuated virus; after they were experimentally infected with the wild-type SARS-CoV-2, they not only did not die, but also did not have any clinical signs of the disease compared to the animals from the control group. The *att*-phenotype of the *ca*-virus was confirmed by the absence of pronounced histopathology in mouse lungs and reduced replication in the internal organs on the 6th day after the immunization compared to the wild-type virus.

The study performed at the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera was focused on the attenuation of the Dubrovka (D) strain of SARS-CoV-2 by cold adaptation (gradual decrease of the growth temperature during 42 passages to 23°C) in Vero CCL-81 cells [32]. Two *ca*-clones of the D strain were obtained: The D-D2 variant having the *ts*-phenotype and capable of replication in Calu-3 human lung cells; and the D-B4 variant that did not have the *ts*-phenotype and lost the ability to replicate in Calu-3 human lung cells. The genome-wide genetic characterization of the D-D2 and D-B4 variants revealed up to 20 nucleotide and 18 amino acid substitutions compared to the parent strain. In the intranasally infected Syrian hamsters, both *ca*-variants demonstrated reduced virulence; they did not slow down the weight gain, significantly more slowly replicated in the lungs and other organs, caused significantly less pronounced inflammatory changes in the lungs compared to the D strain. Thus, it was concluded that for *ca*-variants of SARS-CoV-2, the *ts*-phenotype was not critical for virulence reduction. For example, the D-B4 variant that did not have the *ts*-phenotype and lost its ability to infect Calu-3 human lung cells also demonstrated the reduced virulence in hamsters [23].

Xu et al. attenuated SARS-CoV-2 by passing the virus in the Vero E6 cell culture at the gradually decreased temperature. When the temperature of 21°C was reached, 5 passages were carried out, followed by cloning and assessment of the temperature sensitivity. Finally, the TS11 clone was chosen as having *ca*- and *ts*-phenotypes. The whole-genome analysis of the TS11 clone revealed the deletion leading to the loss of a 12 amino-acid region of the protein in the furin cleavage site in the S protein, and the 371-nucleotide deletion involving *ORF7b-ORF8* genes as well as several point

mutations in *nsp16*, *S*, *E*, *orf7a* and *N* genes. After the intranasal infection with the TS11 clone, the Syrian hamsters continued to gain weight and did not demonstrate any signs of the disease. TS11 successfully replicated in the nasal cavity, but not in the lungs, causing only minor lesions in them. By the 20th day after the immunization, the histological analysis did not detect any traces of inflammation in the lungs [24].

Abdoli et al. also obtained the SARS-CoV-2 *ca*-mutant by passing the virus in the Vero cell culture at the gradually decreased temperature. The researchers assume that the attenuation of the obtained KaraVac strain was caused by the double deletion in the S protein: at the S1/S2 junction (the PRRA motif) and at the S1-NTD site (the GTNGTKR motif). The KaraVac strain replicated at 25°C, 33°C and 39°C, though not at 41°C. Compared to the control group infected with the wild-type strain, the immunized Syrian hamsters did not have any weight loss and did not have any other signs of the disease [22].

At the same time, Li et al. developed an attenuated variant of SARS-CoV-2 by performing serial passages in the Vero cell culture at 37°C to obtain material for an inactivated vaccine. The developed strain was called VAS5 and had a deletion, which consisted of 21 nucleotides encoding 7 amino acids, and was located upstream of the S1/S2 cleavage site in the S gene. In the Caco-2 and Huh7 cell cultures as well as in human lung epithelial organoid cells, the VAS5 strain replicated significantly more slowly than the wild-type strain. The immunized K18-hACE2 mice did not have any weight loss; no pathological changes were detected in the lungs; only few RNA copies were detected in the lung homogenates [13].

Genetic engineering-based approaches to SARS-CoV-2 attenuation

The development of an attenuated virus by using classical virological methods can take several months, thus posing a problem in the pandemic situation. The advances in genetic engineering promoted new approaches to fast development of vaccine strains using site-directed mutagenesis [34–36] or codon deoptimization [37, 38]. For example, the studies of Murine coronavirus (previously known as *Murine hepatitis virus*), which is a well-studied model coronavirus, have found that sequences of nonstructural NSP14 and NSP16 proteins, which are highly conserved for different coronaviruses, are universal targets for site-directed mutagenesis aimed at reduction of virus virulence. Even a single amino acid substitution resulted in pronounced virus attenuation in mice. At the same time, immunization of the mice with the mutant virus promoted development of a long-term humoral and robust CD4⁺- and CD8⁺-T-cell-mediated immune response as well as full protection against infection with a lethal dose of the virus [39].

Ye et al. also used the SARS-CoV-2 *NSP16* gene as a target, introducing the *D130A* mutation into it. The NSP16 protein is a type I interferon antagonist and is critically important for methylation of the 5' terminal cap structure of viral mRNAs, while the *D130A* point mutation leads to inactivation of the *NSP16* methyltransferase activity. The d16 mutant strain during the extended passaging in the Vero E6 cell culture remained genetically stable and did not demonstrate any signs of virulence reversion. The Syrian hamsters and K18-hACE2 mice experimentally infected with the d16 strain did not demonstrate any weight loss and did not develop the disease [20].

Liu et al. used genes of SARS-CoV-2 accessory proteins as a target, as they are associated with the regulation of virus replication through interaction with host signaling pathways. Genes of the ORF3, ORF6, ORF7 and ORF8 accessory proteins were removed from the genome, and the TRS ACGAAC fragment of the transcription regulatory sequence was replaced with CCGGAT. The resulting attenuated $\Delta 3678$ virus replicated less efficiently in the primary culture of human lung epithelial cells compared to the parent strain, though it retained its replication ability in the Vero E6 cell culture. In the tests using BALB/c mice, the role of each gene in the SARS-CoV-2 attenuation was studied using the SARS-CoV-2 strain adapted to mice. It was found that the ORF3 ($\Delta 3a$) deletion played an important role in the attenuation of the $\Delta 3678$ virus, which could be explained, as assumed by the researchers, by the impact of the ORF3 product on the signaling pathway of the type I interferon. The Syrian hamsters immunized intranasally with the $\Delta 3678$ strain did not lose weight; the viral load in nasopharyngeal, tracheal and lung washes was significantly lower than the viral load in the control group infected with the wild-type strain. After the immunization, the K18-hACE2 mice did not lose weight and did not die even after they had received a high dose of the attenuated virus [18]. The similar results were obtained by Ye et al. in their studies [20].

To obtain an attenuated strain, Liu et al. made modifications in the SARS-CoV-2 (the WA1/2020 isolate) genome: They removed the sequence encoding the PRRA peptide upstream of the furin cleavage site, removed ORFs6-8s, which are interferon antagonists, introduced K164A/H165A mutations into the C-terminal domain of the NSP1 protein. The developed strain WA1- Δ PRRA- Δ ORF6-8-Nsp1^{N128S/K129E} demonstrated poorer replication than the original virus in the MatTek EpiAirway human tracheal and bronchial epithelial cell culture and caused only mild lung lesions in infected K18-hACE2 transgenic mice and Syrian hamsters [19].

A slightly different approach was used by Yoshida et al. [17]. Using reverse genetics methods, they obtained a library of 659 mutant clones based on the clinical isolate of SARS-CoV-2 B.1.1 lineage (Pango). To identify the *ts*-phenotype, they grew clones using two

temperature regimes – 32°C and 37°C, selecting clones that did not have a cytopathic effect at 37°C for further tests. The experimental infection of Syrian hamsters also confirmed the *att*-phenotype of the selected *ts*-strains, which was characterized by the absence of weight loss, reduced replicative activity of the virus in the respiratory tract, less pronounced pneumonia compared to the original strain [17].

For the SARS-CoV-2 attenuation, some researchers used the codon deoptimization technique involving replacement of original codons with suboptimal ones while preserving amino acid sequences of viral proteins [38]. Such alterations have a direct effect on the rates of viral protein production and genome replication, being responsible for attenuation of the virus [38]. Using this technique, Trimpert et al. recoded most of the SARS-CoV-2 genomic sequence and obtained several candidate vaccine strains. Codons that can be rarely found in the human genome were selected for deoptimization. The sCDP9 and sCDP10 strains selected for further tests replicated more poorly in the cell culture than the original strain and remained genetically stable during 10 passages in the Vero E6 cell culture. The intranasally immunized Syrian hamsters had minor losses in weight, but quickly regained it; they did not demonstrate any signs of the disease, had less significant inflammatory changes in the lungs [15].

Using the codon deoptimization technique, Codagenix (United States) developed the CoviLivTM vaccine [16]. The *S* gene served as a target for deoptimization. After the immunization with the vaccine strain, Syrian hamsters did not lose weight; the histological examination of the lungs on the 6th day detected only minor inflammatory changes. The infectious titer in the lungs of hamsters was measured at the limit of detection for this technique, thus being indicative of extremely low replicative activity of the vaccine strain in the lungs.

The **Table** summarizes the experience of different research groups in the development of attenuated variants of SARS-CoV-2.

Immunogenic potential of live-attenuated vaccines against COVID-19

The protective activity demonstrated by most of the licensed vaccines against COVID-19, which are designed to develop humoral immunity, depends on induction of neutralizing antibodies to nonstructural surface S protein of SARS-CoV-2 (**Fig. 2, a**). However, the pressure of artificial selection induced by mass immunization makes this target highly variable, thus leading to virus evasion of immune surveillance and a rapid decrease in the efficacy of vaccines against re-emerging variants of SARS-CoV-2 [6, 7]. These vaccines do not provide sterilizing immunity [40] and robust mucosal immunity [41].

In natural infection with SARS-CoV-2, the immune response is developed against all viral proteins — both structural and nonstructural. The M and

Methodological approaches to SARS-CoV-2 attenuation after intranasal administration

Strain name	Attenuation strategy	Animal model on which the <i>att</i> phenotype was established	Reference
D-D2 и D-B4	Cold adaptation in Vero cell culture up to 23°C	Syrian golden hamsters	[23]
CoV-2-CNUHV03-CA22°C	Cold adaptation in Vero cell culture up to 22°C	K18-hACE2 mice	[21]
Δ3678	ORF3, ORFs6-8 deletion, changing ACGAAC to CCGGAT in TRS	K18-hACE2 mice, Syrian golden hamsters	[18]
KaraVac	Cold adaptation in Vero cell culture up to 25°C	Syrian golden hamsters	[22]
sCPD9 и sCPD10	Codon-pair deoptimization	Syrian hamsters, Roborovski dwarf hamster	[15]
VAS5	Serial passages in Vero cell culture	K18-hACE2 mice, hamsters	[13]
TS11	Cold adaptation in Vero cell culture up to 21°C	Syrian golden hamsters	[24]
Coviliv (COVI-VAC)	Codon-pair deoptimization of S-gene	Syrian golden hamsters	[16]
rTS-all	Random mutagenesis and generation by reverse genetic methods strain with all necessary <i>ts</i> -related mutations	Syrian golden hamsters	[17]
WA1-ΔPRRA-ΔORF6-8-Nsp1 ^{K164A/H165A}	ORFs6-8 deletion, removing PRRA upstream of the furin cleavage site, introducing K164A/H165A into the C-terminus of NSP1	K18-hACE2 mice, Syrian golden hamsters	[19]
d16	Point mutation <i>D130A</i> in <i>NSP16</i> gene	K18-hACE2 mice, Syrian golden hamsters	[20]

N structural proteins are highly immunogenic and, together with nonstructural proteins, are more conserved than the S protein. In addition, many T-cell epitopes of phylogenetically related species of coronaviruses and different variants of SARS-CoV-2 are not located in the S protein [42, 43]. If an infected organism develops an effective T-cell-mediated immune response, they do not develop a systemic excessive inflammatory response, thus presenting a mild, sometimes asymptomatic case. If the development of the T-cell-mediated (and consequently humoral) response is delayed, the dominant role is played by factors of the innate immunity, being manifested at the systemic level and causing a severe disease [44]. It should be noted that the protectivity of the T-cell-mediated immunity depends less on mutations that occur in new variants of SARS-CoV-2, as it is targeted at more conserved viral antigens [45, 46].

The protective activity of live-attenuated vaccines for intranasal application (mucosal vaccines) employs the same mechanisms that participate in the development of acquired immunity during natural infection (Fig. 2, b). When the respiratory virus enters nasal and/or oral cavities, the lymphoid tissues associated with the mucosa of the respiratory and digestive tract turn into the first line of defense against viral infection. This process involves all components of innate upper respiratory immunity - cellular (neutrophils, macrophages, dendritic cells, resident microfold M cells, innate lymphoid cells, natural killer cells and mast cells) as well as soluble molecules (galectins, collectins, cytokines, etc.). The activation of the first line of defense is fol-

lowed by activation of dendritic cells in the focus of infection; they take up, process and present viral antigens. Such activated dendritic cells "loaded" with viral antigens migrate to regional lymph nodes; antigens are presented to naïve T cells, thus triggering their further differentiation and activation of adaptive immunity, which is accompanied by production of cytotoxic T cells and helper T cells. Specific naïve B cells recognize viral antigens either without any assistance or when they are presented by follicular dendritic cells as an antigen-antibody complex in a Fc-receptor-connected manner. The interaction of activated helper T cells and B cells triggers the humoral immune response. The simultaneous expansion of CD4⁺ helper T cells, CD8⁺ cytotoxic T cells in the focus of infection and production of antibodies by plasma cells is of critical importance for elimination of the virus [41, 47, 48]. The combined activation of humoral and cellular components of the systemic and mucosal immune protection can provide effective protection against infection with SARS-CoV-2 [47].

LAVs are administered in different ways: vaccines against measles, rubella, mumps and chicken pox are administered intramuscularly; polio and rotavirus vaccines are given by mouth; LAIV is administered intranasally. The developers of LAVs against COVID-19 use the intranasal administration [15–24]. Different routes of administration have their advantages and disadvantages. For example, intranasal and oral administration provides not only induction of systemic cell-mediated and humoral adaptive immune responses, but also mu-

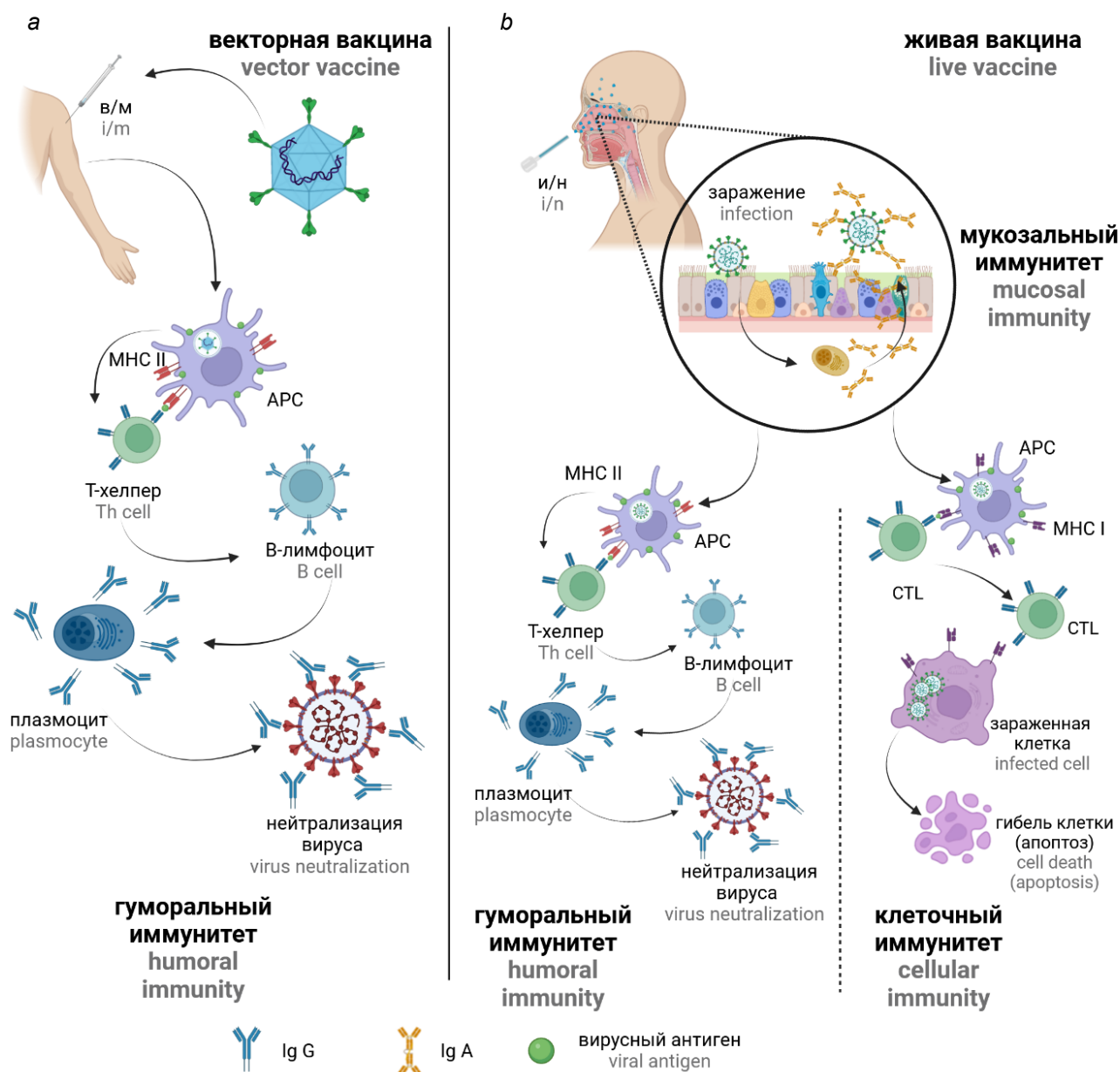


Fig. 2. Mechanisms of induction of an immune response by the intramuscular immunization vaccine containing the S protein and by intranasal vaccination of LAV.

a — vaccines against COVID-19, which are based on the S protein of SARS-CoV-2 (using the example of the viral vector vaccine), induce only a humoral response involving production of virus-neutralizing antibodies; *b* — LAV triggers the mechanisms inducing acquired immunity, which are similar to those engaged in natural infection, including activation not only humoral, but also cell-mediated immunity. In intranasal administration, the vaccine strain infects epithelial cells of the upper respiratory tract, thus inducing both local (mucosal) and systemic immune responses. The established protection including cellular and humoral components provides immunity both at the level of the entrance gate of the infection (mucosa) and at the systemic level.

i/m — intramuscular injection; i/n — intranasal; APC — antigen-presenting cell; CTL — cytotoxic lymphocyte; MHC — major histocompatibility complex.

cosal (local) immunity, including secretion of specific IgA antibodies in the mucosa of the respiratory tract or intestines. In intranasal immunization followed by infection with a virulent strain, specific secretory IgA antibodies neutralize the virus directly in respiratory mucosa, which is the "entrance gate" of the infection, by suppressing its adhesive ability and reducing transmission efficiency [47]. At the same time, if intranasal immunization is performed using an insufficiently attenu-

ated virus, there is a risk of damage that may be caused to the central nervous system through olfactory nerves [48]. For LAVs administered intramuscularly, there is no risk of brain damage; after the second dose of the vaccine, the seroconversion rate reaches 95–100% [49, 50]. Mehla et al. found that when the vaccine strain of SARS-CoV-2 was administered intranasally, the titer of neutralizing antibodies in serum was significantly higher than after intramuscular administration [51].

While, according to WHO¹, the CoviLivTM vaccine is going through phase III of clinical trials, no information is available regarding the safety and efficacy of LAV against COVID-19 for people. At the same time, the official website of the vaccine developer has already announced that the requested report is going to be published soon.² The website confirms that the live-attenuated intranasal vaccine against COVID-19 CoviLivTM is immunogenic, well tolerated by healthy adults, and induces protective cell-mediated immunity against all the known variants of SARS-CoV-2. A total of 48 healthy adult individuals took part in the clinical trials. The company press release informs that the clinical trials for the vaccine are included in the WHO-sponsored program – Solidarity Trial Vaccines, which is aimed to support development of second-generation COVID-19 vaccines having a higher efficacy toward new epidemiologically significant variants, longer protection, more simple storage requirements and a needle-free method of immunization.

The immunogenicity and protective activity of LAVs have been extensively studied only in animal models for coronavirus infection. The main models for preclinical studies of attenuated mutants of SARS-CoV-2 were golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), Roborovski dwarf hamsters (*Phodopus roborovskii*) and K18-hACE2 transgenic mice. In most of the studies, immunized animals developed a protective immune response against the parent strain SARS-CoV-2, which was used for development of an attenuated strain. Syrian hamsters immunized with an attenuated virus and then experimentally infected with the parent strain did not lose weight and did not demonstrate any clinical signs of the disease; the titration of nasal washes and long homogenates showed lower titers of the virus compared to the animals from the control group [17, 18, 22, 23]. Trimpert et al. noted that on the 2nd, 3rd and 5th day after the experimental infection, no infection activity was detected in the lung samples from the immunized animals, thus confirming the establishment of sterilizing immunity [15, 52]. Xu et al. also reported that the hamsters immunized with the *ts*-strain did not demonstrate any signs of infection, even being accidentally cross-infected by the animals infected with the wild-type strain [24]. Liu et al. pointed out that the single-dose intranasal immunization of the Syrian hamsters with the $\Delta 3678$ *att*-strain of SARS-CoV-2 not only protected them against infection with the virulent strain, but also decreased the risk of virus transmission [18]. During their studies, Seo et al. found that the K18-hACE2 mice immunized with the *ca*-strain not only remained alive after the experimental infection, but also did not lose weight and did not have any clinical signs of the disease [21].

Li et al. also assessed the risk of transmission of the SARS-CoV-2 virus from the previously immunized animals after they were infected. On the next day after the infection, the immunized hamsters were put into cages with the hamsters that had not been previously immunized and had not been exposed to the virus; washes were collected on the 3rd and 5th day. On the 3rd day, in non-immune hamsters, viral RNA was detected at the PCR detection limit; on the 5th day, RNA was not detected, thus being indicative of the absent virus transmission through the close contact with the immunized and infected hamsters [13].

At the same time, Liu et al. pointed out possible limitations for immunogenicity assessment using K18-hACE2 mice-based models: Encephalitis caused by the infection with *att*-SARS-CoV-2, which is followed by the death of animals, makes it difficult to interpret the results. To address the above limitation, nasal, lung and brain samples were collected on the 2nd, 4th and 6th day after the infection to measure the viral load. Curiously, even the most attenuated strain WA1- Δ PRRA- Δ ORF6-8-Nsp^{1N128S/K129E} remained neurotropic and was detected in the brain of the K18-hACE2 mice at high levels on the 6th day after the infection [19]. In the studies performed in Syrian hamsters, *att*-strains of SARS-CoV-2 did not demonstrate such high neurotropism and pathological changes in the brain.

LAVs against SARS-CoV-2 have a high potential of cross-protective activity against different variants of the pathogen, as the same mechanisms that are employed in natural infection with the virus are put into action. The natural infection with SARS-CoV-2 prevented up to 90% of re-infection cases with Alpha, Beta or Delta variants [53, 54] and 56% of re-infection cases with the Omicron variant [55]. Most of the re-infection cases occurred one year after the primary disease [55]. Re-infection has become a common thing since the emergence of the Omicron variant and its further evolution. The study performed in Qatar demonstrates that the infection of people with SARS-CoV-2 variants preceding the omicron variant provided less than 60% of protection against re-infection with Omicron subvariants. At the same time, during re-infection with the Omicron variant, the protective effectiveness of the primary infection against development of severe disease forms or death reached 97.3% (95% CI, 94.9–98.6%) regardless of the virus variant that had caused the primary infection [56]. The extremely low percentage of severe and fatal cases after re-infection offers hope that LAVs against COVID-19 will be able to provide cross-protection against different variants of the virus.

Trimpert et al. demonstrated experimentally that when infected with *att*-strains of SARS-CoV-2, laboratory animals develop immunity inducing cross-protection. After Roborovski dwarf hamsters had been immunized with the *att*-Wuhan-like strain, the researchers infected them with Alpha and Beta virus variants circu-

¹ URL: <https://covid19.who.int>

² URL: <https://codagenix.com>

lating at the time of the study. The single-dose intranasal immunization was sufficient to establish protection in the hamsters infected not only with the parent strain of the virus, but also with the unrelated Alpha and Beta variants [52]. The same researchers confirmed the development of immunity providing cross-protection in Syrian hamsters immunized with the sCPD9 *att*-strain and then infected with the Delta strain [57].

Yoshida et al. immunized hamsters intranasally with attenuated and parent SARS-CoV-2 B.1.1 (Wuhan-like) strains and then infected them with the Omicron variant (the BA.1 lineage). In the nasal washes and lung homogenates from the immunized hamsters, the infectious titer was measured at the limit of detection and did not show any significant differences regardless of the strain selected for the immunization, thus being indicative of the development of cross-protection against phylogenetically distant strains, among other strains [17].

However, in hamsters immunized with wild-type strains of Beta and Omicron variants BA.1 and subsequently infected with Wuhan-like, Beta, Delta and Omicron BA.1 strains, Ma et al. revealed low cross-activity of antibodies in the hamsters infected with het-

erologous strains. At the same time, the hamsters previously infected with Omicron and then infected with heterologous Omicron strains demonstrated a booster effect on the production of neutralizing antibodies [58]. Thus, in the authors' opinion, the two-dose infection with heterologous strains induces a strong antiviral immune response, which should be taken into consideration when designing vaccination schedules.

Conclusion

Most of the studies performed using animal models for COVID-19 demonstrated safety and high efficacy of intranasal immunization of animals with *att*-variants of SARS-CoV-2 regardless of the chosen strategy of virus attenuation. The pilot studies confirmed the assumption about protective activity of *att*-strains of SARS-CoV-2 toward heterologous antigenic variants of the virus. The animal model-based findings reported by researchers regarding the virulence and immunogenicity of candidate vaccine strains can hardly be extrapolated to humans without clinical studies. Nevertheless, despite this limitation, the currently gained experience indicates promising prospects in the development of a highly effective LAV against COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Teo S.P. Review of COVID-19 mRNA vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273. *J. Pharm. Pract.* 2022;35(6):947–51. DOI: <https://doi.org/10.1177/08971900211009650>
- Wang H., Zhang Y., Huang B., et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell.* 2020;182(3):713–21.e9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008>
- Wu Z., Hu Y., Xu M., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 2021;21(6):803–12. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30987-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30987-7)
- Al-Sheboul S.A., Brown B., Shboul Y., et al. An immunological review of SARS-CoV-2 infection and vaccine serology: innate and adaptive responses to mRNA, adenovirus, inactivated and protein subunit vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2022;11(1):51. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11010051>
- Khoshnood S., Arshadi M., Akrami S., et al. An overview on inactivated and live-attenuated SARS-CoV-2 vaccines. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022;36:e24418. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24418>
- Bowen J.E., Addetia A., Dang H.V., et al. Omicron spike function and neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of vaccines. *Science.* 2022;377(6608):890–4. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abq0203>
- Dejnirattisai W., Huo J., Zhou D., et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell.* 2022;185(3):467–84.e15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.046>
- Feikin D.R., Higdon M.M., Abu-Raddad L.J., et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet.* 2022;399(10328):924–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00152-0)
- Chen J.M. Should the world collaborate imminently to develop neglected live-attenuated vaccines for COVID-19? *J. Med. Virol.* 2022;94(1):82–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.27335>
- Golawski M., Lewandowski P., Jabłońska I., Delijewski M. The reassessed potential of SARS-CoV-2 attenuation for COVID-19 vaccine development – a systematic review. *Virus-es.* 2022;14(5):991. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14050991>
- Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015;479-480:379–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>
- Zimmerman L.A., Reef S.E., Orenstein W.A. Rubella vaccine—a tale of appropriate caution and remarkable success. *JAMA Pediatr.* 2018;172(1):95–6. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.4178>
- Li X.F., Cui Z., Fan H., et al. A highly immunogenic live-attenuated vaccine candidate prevents SARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters. *Innovation (Camb.)*. 2022;3(2):100221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100221>
- Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine.* 1985;3(5):355–69. DOI: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90124-0)
- Trimpert J., Diertert K., Firsching T.C., et al. Development of safe and highly protective live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidates by genome recoding. *Cell Rep.* 2021;36(5):109493. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109493>
- Wang Y., Yang C., Song Y., et al. Scalable live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate demonstrates preclinical safety and efficacy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2021;118(29):e2102775118. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2102775118>
- Yoshida A., Okamura S., Torii S., et al. Versatile live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine platform applicable to variants induces protective immunity. *iScience.* 2022;25(11):105412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105412>
- Liu Y., Zhang X., Liu J., et al. A live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate with accessory protein deletions. *Nat. Commun.* 2022;13(1):4337. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31930-z>
- Liu S., Stauff C.B., Selvaraj P., et al. Intranasal delivery of a rationally attenuated SARS-CoV-2 is immunogenic and protective in Syrian hamsters. *Nat. Commun.* 2022;13(1):6792. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34571-4>
- Ye Z.W., Ong C.P., Tang K., et al. Intranasal administration of a single dose of a candidate live attenuated vaccine derived from an NSP16-deficient SARS-CoV-2 strain confers sterilizing immunity in animals. *Cell Mol. Immunol.* 2022;19(5):588–601. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00855-4>
- Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-Cov-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-Cov-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4):584. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8040584>
- Abdoli M., Shafaati M., Ghamsari L.K., Abdoli A. Intranasal administration of cold adapted live-attenuated SARS-CoV-2 candidate vaccine confers protection against SARS-CoV-2. *Virus Res.* 2022;319:198857.
- Faizuloev E., Gracheva A., Korchevaya E., et al. Cold-adapted SARS-CoV-2 variants with different temperature sensitivity exhibit an attenuated phenotype and confer protective immunity. *Vaccine.* 2022;41(4):892–902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.12.019>
- Xu J., Liu M., Niu X., et al. The cold-adapted, temperature-sensitive SARS-CoV-2 strain TS11 is attenuated in syrian hamsters and a candidate attenuated vaccine. *Viruses.* 2023;15(1):95. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15010095>
- Hilleman M.R., Buynak E.B., Weibel R.E., et al. Development and evaluation of the Moraten measles virus vaccine. *JAMA.* 1968;206(3):587–90.
- Plotkin S.A., Buser F. History of RA27/3 rubella vaccine. *Rev. Infect. Dis.* 1985;7(Suppl. 1):S77–8. DOI: https://doi.org/10.1093/clinids/7.supplement_1.s77
- Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c. *Nature.* 1967;213(5076):612–4. DOI: <https://doi.org/10.1038/213612a0>
- Smorodintsen A.A., Alexandrova G.A., Chalkova O.U., Selivanov A.A. Experiences in the development of live vaccines against influenza and influenza-like respiratory infections. *Ind. Med. Surg.* 1965;34:53–64.
- Ghendon Y.Z., Polezhaev F.I., Lisovskaya K.V., et al. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect. Immun.* 1984;44(3):730–3. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.44.3.730-733.1984>
- Murphy B.R., Coelingh K. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines. *Viral Immunol.* 2002;15(2):295–323. DOI: <https://doi.org/10.1089/08828240260066242>
- Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.* 1999;9(4):237–44. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199910/12\)9:4<237::aid-rmv252>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4<237::aid-rmv252>3.0.co;2-g)
- Файзулоев Е.Б., Корчевая Е.Р., Грачева А.В. и др. Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(4):397–409. Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Gracheva A.V., et al. Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(4):397–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>. EDN: <https://elibrary.ru/llgegh>

33. Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Самойликов Р.В. и др. Маркеры аттенуации холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. *Медицинский академический журнал*. 2022; 22(2):79–88. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Samoilikov R.V., et al. Attenuation markers of cold-adapted SARS-CoV-2 variants. *Medical Academic Journal*. 2022;22(2):79–88. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108725>
34. Flavell R.A., Sabo D.L., Bandle E.F., Weissmann C. Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1975;72(1):367–71. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.367>
35. Shortle D., Nathans D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1978;75(5):2170–4. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.5.2170>
36. Edelheit O., Hanukoglu A., Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol*. 2009;9:61. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
37. Coleman J.R., Papamichail D., Skiena S., et al. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science*. 2008;320(5884):1784–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1155761>
38. Groenke N., Trimpert J., Merz S., et al. Mechanism of virus attenuation by codon pair deoptimization. *Cell Rep*. 2020;31(4):107586. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107586>
39. Zhang Z., Liu Q., Sun Y., et al. Live attenuated coronavirus vaccines deficient in N7-methyltransferase activity induce both humoral and cellular immune responses in mice. *Emerg. Microbes Infect*. 2021;10(1):1626–37. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1964385>
40. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 2020;586(7830):516–27. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
41. Miteva D., Peshevska-Sekulovska M., Snegarova V., et al. Mucosal COVID-19 vaccines: Risks, benefits and control of the pandemic. *World J. Virol*. 2022;11(5):221–36. DOI: <https://doi.org/10.5501/wjv.v11.i5.221>
42. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020;370(6512):89–94. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
43. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489–501.e15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
44. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021;184(4):861–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
45. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K., et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep. Med*. 2021;2(2):100204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100204>
46. Geers D., Shamier M.C., Bogers S., et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Sci. Immunol*. 2021;6(59):eabj1750. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj1750>
47. Nian X., Zhang J., Huang S., et al. Development of nasal vaccines and the associated challenges. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):1983. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101983>
48. Alu A., Chen L., Lei H., et al. Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed. *EBioMedicine*. 2022;76:103841. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103841>
49. Di Pietrantonj C., Rivetti A., Marchione P., et al. Vaccines for measles, mumps, rubella, and varicella in children. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2021;11(11):CD004407. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004407.pub5>
50. Ma S.J., Li X., Xiong Y.Q., et al. Combination measles-mumps-rubella-varicella vaccine in healthy children: a systematic review and meta-analysis of immunogenicity and safety. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(44):e1721. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001721>
51. Mehla R., Kokate P., Bhosale S.R., et al. A live attenuated COVID-19 candidate vaccine for children: protection against SARS-CoV-2 challenge in hamsters. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(2):255. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020255>
52. Trimpert J., Adler J.M., Eschke K., et al. Live attenuated virus vaccine protects against SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7 (Alpha) and B.1.351 (Beta). *Sci. Adv*. 2021;7(49):eabk0172. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk0172>
53. Deng L., Li P., Zhang X., et al. Risk of SARS-CoV-2 reinfection: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep*. 2022;12(1):20763. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24220-7>
54. Mao Y., Wang W., Ma J., et al. Reinfection rates among patients previously infected by SARS-CoV-2: systematic review and meta-analysis. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2021;135(2):145–52. DOI: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001892>
55. Altarawneh H.N., Chemaitelly H., Hasan M.R., et al. Protection against the omicron variant from previous SARS-CoV-2 infection. *N. Engl. J. Med*. 2022;386(13):1288–90. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2200133>
56. Chemaitelly H., Nagelkerke N., Ayoub H.H., et al. Duration of immune protection of SARS-CoV-2 natural infection against reinfection. *J. Travel Med*. 2022;29(8):taac109. DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taac109>
57. Nouailles G., Adler J.M., Pennitz P., et al. Live-attenuated vaccine sCPD9 elicits superior mucosal and systemic immunity to SARS-CoV-2 variants in hamsters. *Nat. Microbiol*. 2023;8(5):860–74. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01352-8>
58. Ma J., Liu X., Zhou M., et al. A heterologous challenge rescues the attenuated immunogenicity of SARS-CoV-2 omicron BA.1 variant in Syrian hamster model. *J. Virol*. 2023;97(2):e0168422. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01684-22>

Information about the authors

Ekaterina R. Korchevaya[✉] — junior researcher, Laboratory of applied virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Department of Virology, Moscow, Russia, c.korchevaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

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

Ilya N. Dyakov — PhD (Biol.), Head of Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Department of Virology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

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

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

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

The article was submitted 17.05.2023;
accepted for publication 18.06.2023;
published 28.06.2023

Информация об авторах

Корчевая Екатерина Романовна[✉] — м.н.с., лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, c.korchevaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

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

Дьяков Илья Николаевич — к.б.н., зав. лаб. биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5384-9866>

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

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

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

Статья поступила в редакцию 17.05.2023;
принята к публикации 18.06.2023;
опубликована 28.06.2023



Основные группы адъювантов и перспективы их использования для специфической профилактики особо опасных и других инфекционных болезней

Филиппенко А.В.[✉], Труфанова А.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д.

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

Аннотация

Цель данного обзора — анализ опубликованных в последние десятилетия научных работ, посвящённых изучению адъювантной способности веществ различного происхождения и химической природы (адъювантов), и оценка эффективности их применения для вакцинопрофилактики различных инфекций, в том числе особо опасных.

Проведённый анализ литературы, представленной в базах PubMed, Web of Science, Scopus, eLibrary, свидетельствует о том, что поиск новых веществ и препаратов, обладающих способностью усиливать иммунный ответ на антигены, входящие в состав антибактериальных и противовирусных зарегистрированных вакцин, а также экспериментальных профилактических препаратов, является важным и перспективным направлением. Использование различных веществ и соединений в качестве адъювантов усиливает иммуногенную и протективную способность вакцин, позволяет уменьшить антигенную нагрузку на организм человека и создать напряжённый иммунный ответ у лиц со сниженной иммунологической активностью и пожилого возраста. При выборе адъюванта необходимо учитывать направленность его действия на формирование как местного, так и системного специфического иммунного ответа в зависимости от характера возбудителя.

Ключевые слова: адъюванты, вакцины, специфическая профилактика, клеточный и гуморальный иммунный ответ, бактериальные и вирусные инфекции, особо опасные инфекции

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

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

Для цитирования: Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д. Основные группы адъювантов и перспективы их использования для специфической профилактики особо опасных и других инфекционных болезней. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):237–246.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-339> EDN: <https://www.elibrary.ru/ndfwtl>

The main groups of adjuvants and the prospects of their use for the specific prevention of particularly dangerous and other infectious diseases

Anna V. Filippenko[✉], Anastasia A. Trufanova, Inna A. Ivanova, Natalia D. Omelchenko

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

Abstract

The **purpose** of this review is to analyze scientific data on the adjuvant properties of substances of various origin and chemical nature (adjuvants) published in recent decades and to evaluate the effectiveness of their use in the vaccination against various infections, including particularly dangerous ones.

The analysis of the literature data available in PubMed, Web of Science, Scopus, eLibrary databases, indicates that the search for new substances and drugs with the ability to enhance the immune response to antigens

that are part of antibacterial and antiviral registered vaccines, as well as experimental preventive drugs, is an important and promising direction. The use of various substances and compounds as adjuvants enhances the immunogenic and protective properties of vaccines, reduces the antigenic load on the human body and causes a tense immune response in individuals with reduced functioning of immune system and in the elderly. When choosing an adjuvant, it is necessary to take into account the direction of its action on the formation of both local and systemic specific immune response, depending on the nature of the pathogen.

Keywords: adjuvants, vaccines, specific prophylaxis, cellular and humoral immune response, bacterial and viral infections, especially dangerous infections

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

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

For citation: Filippenko A.V., Trufanova A.A., Ivanova I.A., Omelchenko N.D. The main groups of adjuvants and the prospects of their use for the specific prevention of particularly dangerous and other infectious diseases. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):237–246.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-339>

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

Применение современных технологий в создании профилактических препаратов привело к уменьшению побочных эффектов вакцинации, но способствовало снижению их иммуногенности [1]. Наиболее эффективным решением этой проблемы является использование адъювантов, способных усиливать иммуногенную и протективную способность вакцинных препаратов и снижать антигенную нагрузку на организм человека [2]. Адъюванты — это вещества различного происхождения и химической природы, оказывающие неспецифическое стимулирующее действие на иммунный ответ при их совместном применении со специфическими антигенами. Адъюванты делятся на минеральные, бактериальные и их синтетические аналоги, масляные эмульсии, синтетические высокомолекулярные вещества, цитокиновые, комбинированные, корпускулярные, адъюванты растительного происхождения [3]. Для повышения эффективности вакцин при инфекционных заболеваниях используют адъюванты, различные по физико-химическим свойствам, механизму действия, происхождению [4].

Минеральные соединения долгое время были практически единственными разрешёнными к применению адъювантами в составе вакцин, и в настоящее время они остаются одними из самых востребованных адъювантов в составе действующих лицензированных вакцин [5]. Механизм их действия обусловлен воспалительной реакцией в месте введения, что способствует постепенному высвобождению иммуногенного вещества и транспорту иммунокомпетентных клеток в лимфоидные органы для обеспечения преимущественно гуморального иммунного ответа. Такие вещества, как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, кальций фосфат и т.д., входят в состав многих вакцинных препаратов [6, 7]. Недавние исследования показали, что добавление фосфата алюминия к экспериментальной конъюгированной вакцине против холеры усиливает иммунные реакции; выработку специфических антител, активацию В-клеток памяти и увеличивает защиту от токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* [8].

В настоящее время активно изучается возможность использования адъювантов микробного проис-

хождения и их синтетических аналогов для повышения эффективности различных вакцин. Они взаимодействуют с Toll-подобными рецепторами клеток врождённого иммунитета, что способствует в последующем запуску процесса формирования адаптивного иммунного ответа [9]. Хорошо известными бактериальными лигандами являются липополисахарид клеточной стенки бактерий, CpG-олигодезоксинуклеотиды, мурамилдипептид, флагеллин (жгутиковый компонент бактерий) [10].

Доказано наличие высокой адъювантной активности у синтезированной бактериальной ДНК с высоким содержанием CpG-олигонуклеотидов (цитозин-гуанин олигодезоксинуклеотиды). CpG-олигонуклеотиды активируют систему врождённого иммунитета, модулируют иммунный ответ, переключая Th2 на Th1, повышают уровень иммунного ответа даже на слабоиммуногенные антигены [10]. Добавление CpG-олигонуклеотидов в коммерческие вакцины против гепатита В «Engerix-B» (Бельгия) и гриппа «Fluagix» (Германия) привело к усилению иммунного ответа и позволило снизить дозировку белков, входящих в их состав [11]. Высокая эффективность этого препарата показана также при вакцинации против ВИЧ, гриппа, вирусов простого герпеса и папилломы человека, вируса восточного энцефалита лошадей [12].

Иммуностимулирующие свойства CpG-олигонуклеотидов были успешно использованы и при конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы [13]. CpG-олигонуклеотиды, конъюгированные с поверхностным гликопротеином *Yersinia pestis*, вызывали усиленный иммунный ответ и защищали экспериментальных животных от бубонной и лёгочной чумы [14]. Экспериментальная химическая сибиреязвенная комбинированная вакцина с синтетическими CpG-олигонуклеотидами под названием «AV-7909» была допущена к стадии клинических испытаний [15].

Высокой иммуногенной активностью характеризуется мурамилдипептид — один из основных составляющих бактериальной оболочки. Взаимодействуя с рецепторами системы врождённого иммунитета, он запускает широкий спектр иммунологических реакций, которые

приводят в конечном результате к Т-клеточной активации и определяют развитие иммунного ответа по Th1-типу. Адьювантной способностью обладает синтетический аналог мурамилдипептида — ликопид (глюкозамуромилдипептид). Так, сочетанное использование живой бруцеллезной вакцины и ликопида позволило снизить вызванные ежегодной вакцинацией против бруцеллеза патологические проявления, касающиеся системы фагоцитоза и клеточного иммунитета, у лиц, находящихся в зоне риска [16]. Одновременное введение ликопида и вакцины холерной бивалентной химической увеличивало эффективность противохолерной вакцинации в эксперименте даже при снижении рекомендуемой дозы вакцины [17]. Проведены успешные эксперименты, доказывающие целесообразность использования комплексного препарата на основе F1-антигена и клеточных оболочек *Y. pestis* в сочетании с адьювантами — тотальной ДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ и синтетическим мурамилдипептидом для создания эффективной противочумной вакцины, способной активировать как врождённый, так и адаптивный иммунитет [18].

Выявлено наличие адьювантной активности у флагелина — жгутикового компонента бактерий. Показано, что флагеллин в качестве адьюванта усиливал иммунный ответ Th1-типа на антигены чумного микроба, что обеспечивало защиту от респираторной инфекции *Y. pestis* 100% мышей [19].

Водно-масляные адьюванты одними из первых стали использоваться для усиления иммуногенной активности различных антигенов. Среди масляных эмульсионных адьювантов наиболее широко известен полный адьювант Фрейнда, в состав которого входит минеральное масло (85%), а также моноолеатманнит с термоинактивированными *Mycobacterium tuberculosis*. Механизм действия данного адьюванта основан на формировании резервуара антигена, защищённого от деградации, в то время как бактериальные компоненты активируют Т-клеточный иммунный ответ. В настоящее время в медицинской практике данный препарат не используется из-за множества системных и местных побочных реакций [20]. Адьювант MF59, производимый компанией «Novartis» (Швейцария), представляющий собой масляно-водную эмульсию, состоящую из сквалена и поверхностно-активных веществ Tween 80 и Span 85B, входит в состав инактивированной противогриппозной вакцины «FLAUD», которая производится с 1997 г. корпорацией «Chiron» (Великобритания) [21]. MF59 способен индуцировать как клеточные, так и гуморальные иммунные реакции, в том числе выработку высоких титров специфических антител; стимулировать врождённые иммунные клетки к продукции хемокинов, которые, в свою очередь, привлекают лейкоциты в очаг воспаления; усиливать поглонительную способность макрофагов и их миграцию в лимфатические узлы для инициации адаптивного иммунного ответа. Данный препарат обладает меньшей токсичностью по сравнению с адьювантом Фрейнда и хорошо переносится организмом [22].

Высокомолекулярные синтетические вещества различной химической природы, обладающие иммуномодулирующей активностью, в настоящее время являются одними из наиболее перспективных адьювантов. Широко используются в клинической практике препараты совидон (сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридин) и гиалуронат натрия (биополимер, полисахарид). В России производится вакцина против гриппа «Совигрипп», в состав которой включён совидон [23], и вакцина против вирусов простого герпеса «Витагерпавак», содержащая гиалуронат натрия [24].

Синтетические молекулы, принадлежащие к классу имидазохинолинов, являются агонистами TLR7/8-рецепторов и способны индуцировать иммунный ответ Th1 [25]. К таким препаратам относится имиквимод, который при сочетанном применении с квадριвалентной рекомбинантной вакциной против вируса папилломы человека в 94,4% случаев приводил к длительной клинической ремиссии этой хронической инфекции [26]. Использование при вакцинации этого адьюванта, сконъюгированного с антигенами вируса бешенства, в 3 раза увеличивало выживаемость лабораторных животных по сравнению с препаратом, в котором использовались только антигены [27].

Введение иммуномодулятора глутоксима (глутамил-цистеинил-глицин динатрий) повышало иммуногенность экспериментальной вакцины против гепатита E [28].

В ходе исследования целесообразности использования препарата маннатида в качестве адьюванта для интраназальной вакцинации против гриппа у мышей были доказаны его эффективность и безопасность, способность успешно индуцировать как антитела в сыворотке и на слизистых, так и клеточно-опосредованный ответ [29].

В ходе различных экспериментов показано, что полиоксидоний (азоксимера бромид — производное пиперазина (N-окисленного полиэтилена), разработанный в Институте иммунологии МЗ РФ, является универсальным адьювантом для многих антигенов, его использование позволяет снизить риск развития нежелательных реакций у вакцинированных, уменьшить дозы вирусных антигенов, при этом увеличивая их иммуногенность. Этот препарат включён в качестве адьюванта в субъединичную гриппозную вакцину «Гриппол» и в поливакцину для терапии и профилактики хронической герпетической инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1-й и 2-й групп [30].

Введение полиоксидония в состав экспериментальной комбинированной вакцины против вирусного гепатита A и B «Гепол A+B» позволило уменьшить антигенную нагрузку и повысить иммуногенность входящих в состав дивакцины антигенов [31]. Другие исследования показали, что полиоксидоний значительно увеличивал эффективность вакцины против цитомегаловирусов человека и уменьшал количество инъекций вакцинного штамма [32].

Показана эффективность полиоксидония при использовании его в качестве адьюванта при вакцинации против бактериальных особо опасных инфекций. Этот

иммуномодулятор оказывал стимулирующее воздействие на реактивность клеток фагоцитарной системы привитых от чумы лабораторных животных, повышал протективную активность живой противочумной вакцины почти в 3 раза, что сделало возможным существенно снизить дозу вакцины, не теряя при этом эффективности защиты организма от чумной инфекции [33]. Другими авторами путём оценки внутриклеточной экспрессии цитокинов Т-хелперами селезёнки была доказана целесообразность применения полиоксидония при иммунизации экспериментальных животных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ [34].

Полиоксидоний и даларгин (синтетический гексапептид) усиливали протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* [35]. Сочетанное введение экспериментальным животным вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с полиоксидонием или ингароном (интерфероном (ИФН) γ) продемонстрировало, что и тот и другой способствовали активации клеточного и гуморального иммунного ответа, продукции медиаторов клеточного звена иммунитета [36].

Саратовские исследователи установили, что сочетанное использование полиоксидония и вакцинного штамма туляремиального микроба приводило к активации спленоцитов, пониженной интенсивности повреждения макрофагов в селезёнке и брюшной полости экспериментальных животных и повышению титров специфических противотуляремиальных антител [37]. Показана целесообразность использования полиоксидония и даларгина для снижения реактогенных свойств живой туляремиальной вакцины [38].

Об эффективности применения полиоксидония для совершенствования специфической профилактики холеры свидетельствуют эксперименты по созданию конъюгатов диацелированных липополисахаридов сероваров Инаба или Огава, а также В-субъединицы холерного токсина с полиоксидонием. Конъюгаты в большей степени стимулировали антибактериальный и антиоксидантный гуморальный ответ против антигенов по сравнению с используемыми в то время противохолерными вакцинами. Кроме этого, они снижали аллергические и другие побочные реакции на вакцинацию¹. Позднее показано, что полиоксидоний усиливал экспрессию маркеров ранней и поздней активации на иммунокомпетентных клетках, стимулировал пролиферацию CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺-лимфоцитов, увеличивал количество антигенспецифических антителообразующих клеток, выработку специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови и тонком кишечнике экспериментальных животных на начальных этапах формирования противохолерного иммунитета. Причём повышение иммуногенных свойств холерной вакцины под влиянием полиоксидония сохранялось в отдалённые сроки поствакцинального периода [39].

При изучении влияния имунофана (синтетический пептид) на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета, а также на течение и исход инфекционного процесса у экспериментальных животных выявлено, что его применение предотвращало развитие транзитного поствакцинального апоптотического иммунодефицита и снижало степень выраженности инфекционного процесса при экспериментальной холере [40].

Обнаружена способность иммунопрепаратов имунофана и бестима (гамма-D-глутамил-триптофан) повышать иммуногенные свойства противомелиоидозных препаратов, увеличивая выживаемость экспериментальных животных после их заражения высоковирулентными штаммами возбудителя [41].

Показано, что синтетический гликолипид α -галактозилцерамид (α -GalCer), который специфически связывается с CD1d, неклассической молекулой МНС I, способен проявлять адьювантную активность для белковых и ДНК-вакцин. Положительный опыт сочетанного применения α -GalCer с ДНК-вакциной против гриппа позволил сделать вывод о целесообразности использования этого адьюванта при разработке противогриппозных профилактических средств [42]. Внутрижелудочная иммунизация мышей цельноклеточным убитым антигеном *Helicobacter pylori* и α -GalCer индуцировала эффективную иммунную защиту против этого возбудителя, что свидетельствует о перспективности использования этого адьюванта в составе пероральной вакцины против данной инфекции [43]. Пероральное введение α -GalCer в сочетании с вакциной «Dukogal» (Швеция) и с убитым штаммом *Vibrio cholerae* O1 HikojimaMS1342, коэксспрессирующим антигены липополисахарида *Ogawa* и *Inaba* O1 и скомбинированным с рекомбинантной субъединицей В *V. cholerae*, продемонстрировало увеличение иммуногенности как вакцины, так и антигенов возбудителя холеры [44]. Сочетанное применение вакцины против холеры «Dukogal» (Швеция) и сульфатида (сульфатированного гликофинголипида (3-О-сульфо-галактозилцерамид)) приводило к усилению продукции секреторного иммуноглобулина А в кишечнике экспериментальных животных и к активации натуральных киллеров, что свидетельствовало о перспективности применения сульфатида в качестве адьюванта при противохолерной вакцинации [45].

В особую группу иммуноадьювантов выделены цитокины природного и рекомбинантного происхождения. Первые цитокины (ИФН) получали из крови доноров, что было низкорентабельно и довольно затратно. С развитием генно-инженерных технологий были синтезированы современные препараты (виферон, ингарон, интераль и т.д.), содержащие рекомбинантный ИФН- α или ИФН- γ . Показано, что ИФН- α действует как эффективный адьювант для формирования противовирусного иммунитета, а его влияние на дифференцировку и активацию дендритных клеток играет важную роль в индукции защитных реакций при разработке различных противовирусных вакцин [46]. Доказано адьювантное действие препара-

¹ Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. и др. Способ получения вакцины против холеры. Патент РФ № 2021817; 1994 г. (опубликован 27.09.2000).

тов на основе рекомбинантных белков цитокинов — беталейкин (интерлейкин (ИЛ) 1 β), ронколейкин (ИЛ-2), альнорин (фактор некроза опухоли- α), аффинолейкин — при вакцинации против гепатитов А и В, бешенства, клещевого энцефалита у животных. Наиболее эффективно влияние этих иммуoadъювантов проявлялось на экспериментальной модели животных с иммуносупрессией (ответ на специфические антигены увеличивался в 1,5–7,3 раза), а также при использовании малых доз вакцин, на которые, в случае их использования без цитокинов, развивался слабый иммунный ответ [47]. Применение препарата виферон (человеческий генно-инженерный ИФН- $\alpha_2\beta$) при противогриппозной вакцинации способствовало раннему формированию специфического иммунитета и снижало частоту и тяжесть заболевания в эпидемический сезон [48]. При использовании вакцины «Engerix-B» против гепатита В хорошо зарекомендовали себя рекомбинантный ИЛ-1 β и цитокиновый препарат беталейкин, применение которых позволило повысить эффективность вакцинации у больных с вторичными иммунодефицитами и хроническим инфекционным синдромом [49]. ИЛ-12 эффективно применялся в составе вакцины против гепатита В, а также в ДНК-вакцине против гепатита С, повышая их иммуногенность за счёт стимуляции продукции ИЛ-4 и ИФН- γ , усиливающих противовирусную защиту [50]. Применение ИЛ-2 в качестве адъюванта в составе экспериментальной вакцины против гепатита С способствовало активации клеточного звена иммунитета [51]. Последовательное введение ИЛ-6, ИЛ-7 и ИЛ-15 увеличивало формирование CD4⁺-Т-клеток памяти к ДНК-вакцине против ящура [52].

ИЛ-15 в сочетании с ИЛ-21 значительно повышал иммуногенный эффект ДНК-вакцины против инфекции, вызванной *Toxoplasma gondii*, усиливая пролиферацию лимфоцитов [53].

О.Б. Демьянова и соавт. доказали, что рекомбинантные цитокины, воздействуя преимущественно на механизмы клеточного иммунитета, могут быть использованы для повышения иммуногенности и протективности антигенов возбудителя мелиоидоза. При этом для стимуляции первой фазы иммунного ответа целесообразно применение ИФН- γ , инициирующего неспецифические клеточные факторы защиты, а для усиления специфического клеточного иммунного ответа предпочтительно использовать ИЛ-2 [54].

В опытах на взрослых кроликах и морских свинках доказана адъювантная способность препаратов беталейкина (рекомбинантный ИЛ-1 β) и полиоксидония в отношении иммуногенной и протективной активностей живой противочумной вакцины [55].

Было замечено, что для усиления иммуностимулирующего действия на макроорганизм наиболее эффективным было составление комбинации из двух или нескольких адъювантов, входящих в состав вакцинного препарата. Адъювантная активность суммируется, что усиливает иммунный ответ и может активировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет в зависимости от антигенов,

входящих в исследуемую вакцину. Так, комбинация из гидроокиси алюминия и монофосфорилированного липида А, зарегистрированная как адъювантная система AS04, входит в состав вакцины против гепатита В, которая разработана для пациентов с хроническими заболеваниями почек, одобрена и разрешена к применению в США и некоторых европейских государствах [56]. Другая зарегистрированная адъювантная система AS01 состоит из монофосфорилированного липида А и гликозида сапонина, выделяемого из коры *Quillaja saponaria Molina*, инкапсулированных в липосомную структуру. AS01 активирует каспазу-1, способствует активации инфламмосомы и высвобождению ИЛ-1 β , а также ИЛ-18. Высвобождение ИЛ-18 вызывает быструю продукцию ИФН- γ , особенно натуральными киллерами, тем самым способствуя созреванию дендритных клеток и индукции клеточного иммунного ответа. Этот адъювант входит в состав вакцины против малярии [57]. Комбинация адъюванта, полученного из холерного токсина и липидных наночастиц, значительно улучшала иммуногенность и протективность экспериментальной интраназальной универсальной вакцины против гриппа [58]. Включение комбинированного адъюванта, состоящего из субъединицы А холерного токсина и ИЛ-15, в двухвалентную вакцину против сибирской язвы и натуральной оспы приводило к значимому увеличению титра антител и выживаемости экспериментальных животных после заражения спорами сибирской язвы по сравнению с контрольной группой, иммунизированной только вакциной [59].

Особую группу составляют корпускулярные адъюванты. Установлено, что некоторые природные частицы способствуют формированию депо антигена, тем самым усиливая иммунный ответ. О возможности применения в качестве адъювантов при оральной вакцинации против холеры синтезированных мезопористых углеродных наночастиц кремнезема, в которые помещена рекомбинантная частица субъединицы В *V. cholerae*, свидетельствуют результаты, полученные зарубежными авторами. Доказана более высокая эффективность этого комплекса в индукции иммунных реакций, чем при использовании просто антигенов *V. cholerae* [60]. Прототип вакцины, состоящей из конъюгатов антигенов *V. cholerae* с наночастицами золота, показал на модели животных высокую иммуногенность, превосходящую таковую у коммерческой вакцины, используемой в качестве контроля [61]. Оценка эффективности наночастиц селена с налоксаном (антагонистом опиоидных рецепторов) в качестве нового адъюванта для усиления иммунных реакций, вызванных введением убитых *V. cholerae*, выявила значительное увеличение синтеза специфических к *V. cholerae* иммуноглобулинов классов G и A и более высокую выживаемость мышей по сравнению с группой животных, вакцинированных «Dukoral» [62].

Внимания заслуживают также вещества, выделенные из природных растительных компонентов, такие как хитозан, глюкан, манноза, полисахарид инулина и полисахарид китайской лекарственной травы. Они обладают

свойствами внутренней иммуномодуляции, биосовместимости, биоразлагаемости, низкой токсичности и безопасности. Доказано, что различные природные полисахариды усиливают гуморальный, клеточный иммунитет, что позволяет использовать их для повышения иммуногенности многих вакцин [63].

Широко исследуемым природным компонентом является гликозид — сапонин, выделенный из коры растения *Guillaja saponaria*. Получаемый из сапонина иммуностимулирующий комплекс усиливает иммуногенность протеиновых, гликопротеиновых и полисахаридных антигенов, стимулирует секрецию цитокинов, регулирующих клеточный и гуморальный иммунный ответ [64]. Дельта-инулин, кристаллизованная форма полисахарида инулина, выпускаемая как адъювант под торговым названием «Advax», усиливает иммуногенность вакцин, что было показано на различных биомоделях инфицированных вирусами гриппа, японского энцефалита, лихорадки Западного Нила, гепатита В и вирусом иммунодефицита человека [65]. Пептидогликан кислый, выделенный из ростков картофеля и зарегистрированный как лечебный препарат «Иммуномакс», при использовании в качестве адъюванта для синтетической пептидной вакцины против гепатита С в значительной степени увеличивал её иммуногенность [66]. Добавление хитозана (природного биополимера) и альгинатной соли к экспериментальной парентеральной убитой вакцине против холеры значительно улучшало иммунный ответ, о чём свидетельствуют увеличение числа специфических антител, усиление пролиферации иммунокомпетентных клеток и высокая степень защиты от различных доз *V. cholerae* [67].

О возможности использования *транс*-ретиноевой кислоты в качестве адъюванта при специфической профилактике кишечных инфекций свидетельствует то, что приём витамина А за час до пероральной вакцинации против брюшного тифа способствует увеличению секреции секреторного иммуноглобулина А в кишечнике детей [68]. Данный подход может быть простым, дешёвым и безопасным способом предотвращения смертности, вызванной диарейными заболеваниями, для стран с низким уровнем дохода. Применение *транс*-ретиноевой кислоты до вакцинации снижает воспалительный процесс в тонком кишечнике, а также повышает иммунный ответ и защитную эффективность экспериментальной пентавалентной вакцины из везикул наружных мембран *V. cholerae* [69].

Таким образом, анализ современной литературы показал, что для повышения эффективности вакцинации против бактериальных и вирусных инфекций в качестве адъювантов широко используются различные вещества и соединения как природного, так и синтетического происхождения. Применение иммуноадъювантов усиливает иммуногенную и протективную способность вакцинных препаратов, позволяет снизить антигенную нагрузку на организм человека и создать напряжённый иммунный ответ у лиц со сниженной иммунологической активностью и пожилого возраста.

Наши представления о механизмах взаимодействия адъювантов с клетками иммунной системы организма остаются неполными. Необходимо продолжать исследования в этой области, поскольку это имеет решающее значение для использования существующих и новых препаратов в стимуляции развития оптимального иммунного ответа против различных возбудителей инфекции [70, 71]. При выборе адъюванта необходимо учитывать направленность его действия на формирование как местного, так и системного специфического иммунного ответа в зависимости от характера патогена. Поиск новых веществ и препаратов, обладающих способностью усиливать иммунный ответ на антигены, входящие в состав антибактериальных и противовирусных вакцин, является важным и перспективным направлением разработки и совершенствования профилактических средств против различных инфекций, в том числе особо опасных.

Несмотря на очевидные успехи, которые были достигнуты по применению новых адъювантов для совершенствования существующих и экспериментальных вакцин, разработчики вакцин не спешат применять их в клинической практике в основном из-за отсутствия данных по корреляции адъювантности *in vitro* и *in vivo* [72].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- O'Neill K.L., Shrimali P.C., Clapaks Z.P., et al. Supramolecular vaccine systems based on peptides. *Acta Biomater.* 2021;(133):153–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.003>
- Di Pasquale A., Preiss S., Tavares Da Silva F., Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel)*. 2015;3(2):320–43. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
- Миронов А.Н., ред. *Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 3.* М.; 2014. Mironov A.N., ed. *Guidelines for the Examination of Medicines. Volume 3.* Moscow; 2014.
- Васильева Д.В., Григорьева М.С., Ворфоломеева Е.В. и др. Иммуноадъюванты, классификация и их применение в фармацевтическом производстве. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2017;(3):80–8. Vasil'eva D.V., Grigor'eva M.S., Vorfolomeeva E.V., et al. Immunoadjuvants, its classification and application in pharmaceutical industry. *Drug Development & Registration.* 2017;(3):80–8. EDN: <https://www.elibrary.ru/zrqdnf>
- Facciola A., Visalli G., Laganà A., Di Pietro A. An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(5):819. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>
- Семакова А.П., Микшис Н.М. Адъювантные технологии в создании современных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016;(2):28–35. Semakova A.P., Mikshis N.M. Adjuvant technologies in the construction of advanced vaccines. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2016;(2):28–35. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-28-35>. EDN: <https://www.elibrary.ru/wcdosp>
- Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кутырев В.В. Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2017;94(4):112–26. Mikshis N.I., Popova P.Yu., Semakova A.P., Kuttyrev V.V. Licensed anthrax vaccines

- and experimental preparations at the stage of clinical trials. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;94(4):112–26.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-4-112-126>
EDN: <https://www.elibrary.ru/ysqabn>
8. Jeon S., Kelly M., Yun J., et al. Scalable production and immunogenicity of conjugated cholera vaccine. *Vaccine*. 2021;39(47):6936–46.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.10.005>
 9. Laupèze B., Hervé C., Di Pasquale A., et al. Adjuvant systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*. 2019;37(38):5670–80.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.098>
 10. Iho S., Moema J., Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2015;11(3):755–60.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004033>
 11. Gupta K., Cooper C. A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs R. D*. 2008;9(3):37–145.
DOI: <https://doi.org/10.2165/00126839-200809030-00001>
 12. Ma J.Z., Wang H.L., Zheng X.X., et al. CpG/Poly (I:C) mixed adjuvant priming enhances the immunogenicity of a DNA vaccine against eastern equine encephalitis virus in mice. *Int. Immunopharmacol*. 2014;19(1):74–80.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.01.002>
 13. Ali R., Naqvi R., Kumar S., et al. Multiple antigen peptide containing B and T cell epitopes of F1 antigen of *Yersinia pestis* showed enhanced Th1 immune response in murine model. *Scand. J. Immunol*. 2013;77(5):361–71.
DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.12042>
 14. Hickey A.J., Lin J.S., Kummer L.W., et al. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun*. 2013;81(6):2123–32.
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00316-13>
 15. Minang J., Inglefield J., Harris A., et al. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with Anthrax Vaccine Adsorbed Plus CpG 7909 (AV7909). *Vaccine*. 2014;32(50):6847–54.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.096>
 16. Богачева Н.В., Охалкина В.Ю., Пяткова Н.В. и др. Экспериментальное изучение влияния иммуномодуляторов на эффективность применения вакцины бруцеллезной живой сухой. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(2):84–91. Bogacheva N.V., Okhalkina V.Yu., Pyatkova N.V., et al. Experimental research of the influence of immunomodulators on efficiency using of brucellosis living dry vaccine. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(2):84–91.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-2-84-92>
EDN: <https://www.elibrary.ru/xgvccz>
 17. Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Пасюкова Н.И. и др. Совершенствование специфической профилактики холеры с помощью иммуномодуляторов. *Медицинская иммунология*. 2021;23(4):915–20. Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Pasyukova N.I., et al. Improvement of specific cholera prevention using immunomodulators. *Medical Immunology*. 2021;23(4):915–20.
DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IOS-2248>
EDN: <https://www.elibrary.ru/oxlkhp>
 18. Войткова В.В., Дубровина В.И., Витязева С.А. и др. Оценка иммуномодулирующих свойств субклеточных фракций чумного микроба в сочетании с адьювантами. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(4):83–8. Voitkova V.V., Dubrovina V.I., Vityazeva S.A., et al. Assessment of immunomodulating properties of *Yersinia pestis* subcellular fractions in combination with adjuvants. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(4):83–8.
EDN: <https://www.elibrary.ru/sjwhjt>
 19. Mizel S.B., Graff A.H., Sriranganathan N., et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective vaccine against plague in mice and two species of non-human primates. *Clin. Vaccine Immunol*. 2009;16(1):21–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00333-08>
 20. Stills H. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J*. 2005;46(3):280–93.
DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
 21. Vesikari T., Groth N., Karvonen A., et al. MF59-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD) in children: safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination. *Vaccine*. 2009;27(45):6291–5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.004>
 22. De Gregorio E., Caproni E., Ulmer J.B. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front. Immunol*. 2013;4:214.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00214>
 23. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К. и др. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адьювантной вакцины совгрипп у добровольцев 18–60 лет. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(2):72–8. Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., et al. The results of studying the safety and immunogenicity of domestic subunit adjuvanted vaccine Sovgripp in volunteers from 18 to 60 years old. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(2):72–8.
EDN: <https://www.elibrary.ru/sbeunx>
 24. Баринский И.Ф., Алимбарова А.Л., Лазаренко А.А. и др. Вакцины как средство специфической иммунокоррекции при герпетических инфекциях. *Вопросы вирусологии*. 2014;59(1):5–11. Barinskii I.F., Alimbarova A.L., Lazarenko A.A., et al. Vaccines as an approach to the immunocorrection in herpetic infections. *Problems of Virology*. 2014;59(1):5–11. EDN: <https://www.elibrary.ru/rydill>
 25. Kiefer M.E., Patel A.M., Hollingsworth S.A., Siganeesh W.M. Small molecule agonists of toll-like receptors 7 and 8: a patent review 2014 – 2020. *Expert Opin. Ther. Pat*. 2020;30:825–45.
DOI: <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1825687>
 26. Протасов А.Д., Тезиков Ю.В., Костинов М.П. и др. Сочетанное применение вакцинации и иммунопрепарата в достижении длительной клинической ремиссии хронической ВПЧ-инфекции, проявляющейся остроконечными кондиломами аногенитальной области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(3):60–6. Protasov A.D., Tezikov Yu.V., Kostinov M.P., et al. Combined use of vaccination and immunotherapy drugs to achieve a long-term clinical remission in patients with chronic HPV-infection manifested in condyloma acuminata of the anogenital area. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(3):60–6.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-3-60-66>
EDN: <https://www.elibrary.ru/wclzdb>
 27. Liu R., Wang J., Yang Y., et al. Rabies virus lipopeptide conjugated to a TLR7 agonist improves the magnitude and quality of the Th1-biased humoral immune response in mice. *Virology*. 2016;497:102–10.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.019>
 28. Гуляев С.А., Ляшенко А.А., Чумаков А.М. и др. Изучение иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита Е. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;(3):35–43. Gulyaev S.A., Lyashenko A.A., Chumakov A.M., et al. Study of immunogenicity of a prototype vaccine against hepatitis E. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(3):35–43.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-3-35-43>
EDN: <https://www.elibrary.ru/yrzdkc>
 29. Ren S.T., Zhang H.M., Sun P.F., et al. Intranasal immunization using Mannatide as a new adjuvant for inactivated influenza vaccine and its adjuvant effect compared to MF59. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169501.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169501>

30. Караулов А.В., Быков А.С., Волкова Н.В. Обзор исследований вакцин семейства Гриппол и развития современных адъювантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019;18(4):101–24. Karaulov A.V., Bykov A.S., Volkova N.V. Review of Grippol family vaccine studies and modern adjuvant development. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(4):101–24. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-101-119> EDN: <https://www.elibrary.ru/pnipxk>
31. Горбунов М.А., Ельшина Г.А., Игнатъев Г.М. и др. Характеристика комбинированной вакцины против гепатитов А и В с полиоксидонием (Гепол А+В) по результатам клинических испытаний. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2010;(3):14. Gorbunov M.A., El'shina G.A., Ignat'ev G.M., et al. Characteristics of the combined hepatitis A and B vaccine with polyoxidonium (Hepol A+B) based on the results of clinical trials. *BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2010;(3):14. EDN: <https://www.elibrary.ru/refpet>
32. Баринский И.Ф., Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А. и др. Иммуномодуляторы и специфические инактивированные вакцины как средство экстренной профилактики острых вирусных инфекций и профилактики рецидивов хронических вирусных заболеваний. *Иммунология*. 2015;36(2):95–8. Barinskii I.F., Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., et al. Immunomodulators and inactivated vaccines as means of prompt prophylaxy of acute viral infections and of chronic viral diseases control. *Immunology*. 2015;36(2):95–8. EDN: <https://www.elibrary.ru/rshhnl>
33. Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. и др. Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/С, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием. *Российский иммунологический журнал*. 2019;13(4):1412–20. Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., et al. Blood leukocyte phagocytic and cytokine-producing activity of anti-plague vaccinated BALB/c line mice against the background of immunomodulation by polyoxidonium. *Russian Journal of Immunology*. 2019;13(4):1412–20. EDN: <https://www.elibrary.ru/ajquesc>
34. Ключева С.Н., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Влияние иммуномодуляции на внутриклеточную экспрессию цитокинов Т-хелперами селезёнки мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(2):156–62. Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. Influence of immunomodulation on intracellular cytokine expression by spleen t-helpers of mice immunized by *Yersinia pestis* EV NIEG. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(2):156–62. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-28> EDN: <https://www.elibrary.ru/nfcufl>
35. Шуковская Т.Н., Курьелина А.Ф., Шавина Н.Ю., Бугоркова С.А. Влияние полиоксидония, Poly (I:C), даларгина на защитное действие вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ при экспериментальной чуме. *Российский иммунологический журнал*. 2020;23(1):41–50. Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F., Shavina N.Yu., Bugorkova S.A. Influence of polyoxidonium, Poly(i:c), dalargin on the protective efficacy of *Yersinia pestis* vaccine strain EV line NIEG in experimental plague. *Russian Journal of Immunology*. 2020;23(1):41–50. DOI: <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP> EDN: <https://www.elibrary.ru/jewstw>
36. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М. и др. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):71–7. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., et al. Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG in combination with immune-modulators. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):71–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77> EDN: <https://www.elibrary.ru/fbjedk>
37. Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Бугоркова С.А. Влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(3):94–100. Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Bugorkova S.A. The impact of immunomodulators on reactivity the immune system cells in model vaccinal process against tularemia. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(3):94–100. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-3-94-101> EDN: <https://www.elibrary.ru/wclzep>
38. Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А. Эффект иммуномодуляторов и противотуляремийной вакцинации на апоптоз и лизис спленоцитов, взаимодействующих *in vitro* с тулярином. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):90–4. Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A. Effect of immunomodulators and anti-tularemia vaccination on apoptosis and lysis of splenocytes interacting with tularin *in vitro*. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):90–4. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-90-94> EDN: <https://www.elibrary.ru/zhgwch>
39. Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А. Влияние иммуномодуляторов на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):81–92. Filippenko A.V., Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A. The influence of immunomodulators on the formation of vaccine-induced cholera immunity. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(1):81–92. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-188> EDN: <https://www.elibrary.ru/shtorf>
40. Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Телесманич Н.Р. и др. Изучение роли апоптоза лимфоцитов, индуцированного антигенами *Vibrio cholerae*, в формировании вторичного иммунодефицита и возможности его коррекции. *Медицинский вестник Юга России*. 2013;(1):24–7. Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Telesmanich N.R., et al. The study of lymphocyte apoptosis induced by *Vibrio cholerae* antigens in the formation of immunodeficiency and the possibility of its correction. *Medical Herald of the South of Russia*. 2013;(1):24–7. DOI: <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2013-1-24-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/pxfvhd>
41. Хабарова И.А., Жукова С.И., Ротов К.А. и др. Экстренная профилактика экспериментального мелиоидоза с использованием синтетических иммуномодуляторов и гетерологичных вакцин. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2018;22(3):340–50. Khabarova I.A., Zhukova S.I., Rotov K.A., et al. Emergency prophylaxis of experimental melioidosis using synthetic immunomodulators and heterologous vaccines. *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series: Medical*. 2018;22(3):340–50. DOI: <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2018-22-3-340-350> EDN: <https://www.elibrary.ru/ynajxn>
42. Fotouhi F., Shaffifar M., Farahmand B., et al. Adjuvant use of the NKT cell agonist alpha-galactosylceramide leads to enhancement of M2-based DNA vaccine immunogenicity and protective immunity against influenza A virus. *Arch. Virol*. 2017;162(5):1251–60. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3230-7>
43. Longet S., Abautret-Daly A., Davitt C.J.H., et al. An oral alpha-galactosylceramide adjuvanted *Helicobacter pylori* vaccine induces protective IL-1R- and IL-17R-dependent Th1

- responses. *NPJ vaccines*. 2019;4:45.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0139-z>
44. Davitt C.J.H., Longet S., Albutti A., et al. Alpha-galactosylceramide enhances mucosal immunity to oral whole-cell cholera vaccines. *Mucosal Immunol*. 2019;12(4):1055–64.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0159-z>
45. Albutti A., Longet S., McEntee C.P., et al. Type II NKT cell agonist, sulfatide, is an effective adjuvant for oral heat-killed cholera vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(6):619.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9060619>
46. Aricò E., Belardelli F. Interferon- α as adjuvants of antiviral and antitumor vaccines: mechanisms of action and response signature. *J. Interferon Cytokine Res*. 2012;32(6):235–47.
DOI: <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0077>
47. Алпатов Н.А., Никитина Т.Н., Авдеева Ж.И. Иммуноадыювантное действие препаратов цитокинового ряда. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2010;(3):26–7. Alpatova N.A., Nikitina T.N., Avdeeva Zh.I. Immunoadjuvant effect of cytokine-type drugs. *Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2010;(3):26–7.
EDN: <https://www.elibrary.ru/refplr>
48. Чеботарева Т.А., Каряева С.К., Малиновская В.В. и др. Современные возможности повышения эффективности вакцинации против гриппа у детей высокого риска заболеваемости. *Иммунология*. 2011;32(3):146–50. Chebotareva T.A., Karyayeva S.K., Malinovskaya V.V., et al. Modern instruments for the improvement of the efficacy of anti-influenza vaccination in children of high-risk groups. *Immunology*. 2011;32(3):146–50.
EDN: <https://www.elibrary.ru/nwgvfr>
49. Симбирцев А.С., Петров А.В., Пигарева Н.В., Николаев А.Т. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адыювантов при вакцинации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2011;(1):16–20. Simbirtsev A.S., Petrov A.V., Pigareva N.V., Nikolaev A.T. New opportunities for using recombinant cytokines as adjuvants for vaccination. *Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2011;(1):16–20.
EDN: <https://www.elibrary.ru/rtdten>
50. Naderi M., Saeedi A., Moradi A., et al. Interleukin-12 as a genetic adjuvant enhances hepatitis C virus NS3 DNA vaccine immunogenicity. *Viol. Sin*. 2013;28(3):167–73.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-013-3291-z>
51. Kupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zykhova A.A., et al. The combination of three adjuvants increases the immunogenicity of a recombinant protein containing CTL epitopes of nonstructural hepatitis C virus proteins. *Virus Res*. 2020;284:197984.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197984>
EDN: <https://www.elibrary.ru/hwnsfs>
52. Su B., Wang J., Zhao G., et al. Sequential introduction of cytokine genes to enhance cellular immune responses and CD4 (+) memory T cells during DNA vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2012;8(11):1659–67.
DOI: <https://doi.org/10.4161/hv.22105>
53. Li Zi., Chen J., Petersen E., et al. Synergy of mIL-21 and mIL-15 in enhancing DNA vaccine efficacy against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine*. 2014;32(25):3058–65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.042>
54. Демьянова О.Б., Жукова С.И., Занкович А.А. и др. Использование цитокинов и синтетических пептидов для повышения иммуногенности мелиоидозных антигенов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(3):83–5. Dem'yanova O.B., Zhukova S.I., Zankovich A.A., et al. Application of cytokines and synthetic peptides for increase in immunogenicity of melioidosis antigens. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(3):83–5.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-83-85>
EDN: <https://www.elibrary.ru/snkbt>
55. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;91(6):108–12. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., et al. Effect of immune modulation on immunogenic and protective activity of a live plague vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014;91(6):108–12.
EDN: <https://www.elibrary.ru/tucmmt>
56. Giannini S., Hanon E., Moris P., et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24(33-34):5937–49.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.005>
57. Coccia M., Collignon C., Hervé K., et al. Cellular and molecular synergy in AS01-adjuvanted vaccines results in an early IFN γ response promoting vaccine immunogenicity. *NPJ Vaccines*. 2017;2:25.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0027-3>
58. Bernasconi V., Norling K., Gribonika I., et al. A vaccine combination of lipid nanoparticles and a cholera toxin adjuvant derivative greatly improves lung protection against influenza virus infection. *Mucosal Immunol*. 2021;14(2):523–36.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0334-2>
59. Park D.B., Ahn B.E., Son H., et al. Construction of a bivalent vaccine against anthrax and smallpox using the attenuated vaccinia virus KVAC103. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):76.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02121-5>
60. Karimi Bavandpour A., Bakhshi B., Najar-Peerayeh S. The roles of mesoporous silica and carbon nanoparticles in antigen stability and intensity of immune response against recombinant subunit B of cholera toxin in a rabbit animal model. *Int. J. Pharm*. 2020;573:118868.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118868>
61. Дыкман Л.А., Волох О.А., Громова О.В. и др. Получение и характеристика антител к протективным антигенам холерного вибриона, конъюгированным с наночастицами золота. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2020;490(1):27–30. Dykman L.A., Volokh O.A., Gromova O.V., et al. Obtaining and characteristic of antibodies to *Vibrio cholerae* protective antigens conjugated with gold nanoparticles. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2020;490(1):19–21.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S1607672920010068>
EDN: <https://www.elibrary.ru/gsuqoe>
62. Raahati Z., Bakhshi B., Najar-Peerayeh S. Selenium nanoparticles induce potent protective immune responses against *Vibrio cholerae* WC vaccine in a mouse model. *J. Immunol. Res*. 2020;2020:8872288.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8874288>
63. Sun B., Zhao D., Guo S., et al. Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2018;36(35):5226–34.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.040>
64. Gao S., Basu S., Yang Z., et al. Bioavailability challenges associated with development of saponins as therapeutic and chemopreventive agents. *Curr. Drug Targets*. 2012;13(14):1885–99.
DOI: <https://doi.org/10.2174/138945012804545498>
65. Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А. и др. Адыюванты на основе углеводов для производства вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2):81–91. Kurashova S.S., Dzagurova T.K., Ishmukhametov A.A., et al. Carbohydrate-based adjuvants for vaccine production. *Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2):81–91.
DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91>
EDN: <https://www.elibrary.ru/xqreju>
66. Егорова Е.А., Колесанова Е.Ф., Мельникова М.В. и др. Разработка синтетической пептидной вакцины против гепатита С. *Медицинская иммунология*. 2015;17(S):385. Egorova E.A., Kolesanova E.F., Mel'nikova M.V., et al. Development

- of a synthetic peptide vaccine against hepatitis C. *Medical Immunology*. 2015;17(S):385.
EDN: <https://www.elibrary.ru/qmxibv>
67. AbdelAllah N.H., Gaber Y., AbdelGhani S., et al. Chitosan and alginate salt as biomaterials are potential natural adjuvants for the killed cholera vaccine. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2022;109(12):2462–70.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37240>
68. Hao X., Zhong X., Sun X. The effects of all-trans retinoic acid on immune cells and its formulation design for vaccines. *AAPS J*. 2021;23(2):32.
DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00565-1>
69. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., et al. Retinoic acid pretreatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine*. 2017;35(28):3534–47.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.036>
70. Pulendran B., Arunachalam P.S., O'Hagan D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2021;20(6):454–75.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>
71. Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Лысикова С.Л. и др. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):245–56. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Lysikova S.L., et al. General characteristics of adjuvants and their mechanism of action (part 1). *BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):245–56.
DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256>
EDN: <https://www.elibrary.ru/fvcbgm>
72. Singleton K.L., Joffe A., Leitner V.V. Review: Current trends, challenges, and success stories in adjuvant research. *Front. Immunol*. 2023;14:1105655.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1105655>

Информация об авторах

Филиппенко Анна Владимировна[✉] — м.н.с. лаб. иммунологии Ростовского-на-Дону противочумного институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, filippenko.annushka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>

Труфанова Анастасия Александровна — м.н.с. лаб. иммунологии Ростовского-на-Дону противочумного институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>

Иванова Инна Александровна — к.б.н., в.н.с. с врио зав. лаб. иммунологии Ростовского-на-Дону противочумного институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>

Омельченко Наталья Дмитриевна — к.м.н., с.н.с. лаб. иммунологии Ростовского-на-Дону противочумного институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>

Участие авторов. Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д. — разработка концепции; Филиппенко А.В., Труфанова А.А. — проведение исследования. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 29.12.2022;
принята к публикации 03.03.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Anna V. Filippenko[✉] — junior researcher, Laboratory of immunology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, filippenko.annushka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>

Anastasia A. Trufanova — junior researcher, Laboratory of immunology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>

Inna A. Ivanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher with Acting Head, Laboratory of immunology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>

Natalia D. Omelchenko — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of immunology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>

Author contribution. Filippenko A.V., Trufanova A.A., Ivanova I.A., Omelchenko N.D. — concept development; Filippenko A.V., Trufanova A.A. — conducting research. All authors made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 29.12.2022;
accepted for publication 03.03.2023
published 28.06.2023



Кишечная микробиота и канцерогенез: актуальные аспекты

Повещенко А.Ф., Черкас В.Н.✉, Кабаков А.В., Казаков О.В.

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

Аннотация

Микробиота совместно с хозяином формируют симбиотические отношения, в которых микробиота играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма человека, выполняя значимые функции: энергетический обмен, созревание и поддержание иммунной системы, синтез витаминов, регуляцию обратного всасывания в кишечнике желчных кислот и др. Научные исследования последних лет внесли значительный вклад в понимание сложной связи между микробиотой и рядом патологий человека, включая злокачественные новообразования.

В обзоре рассмотрены механизмы возможного влияния бактерий на развитие и прогрессию рака с акцентом на проканцерогенные свойства микробиоты. Отражено, что важнейшим фактором механизма влияния микробиоты на канцерогенез являются токсины, продуцируемые микроорганизмами, которые индуцируют прямые реакции повреждения ДНК клеток хозяина, вызывая мутации ДНК, нарушения её точной репликации, а также провоцируют нарушение баланса пролиферации и апоптоза клеток хозяина, их быстрое старение и онкогенез. Рассмотрены вероятные механизмы участия микроорганизмов в развитии рака через активацию TLRs и NLRs рецепторов, обладающих опухоль-активирующим эффектом. Приводится краткий обзор механизмов канцерогенеза, связанных с метаболической активностью микробиоты за счёт процессов регуляции выработки вторичных желчных кислот, активации проканцерогенных соединений: фенолов, этанола, сульфидов, аммиака, нитрозаминов. Описано влияние микробиоты на метаболизм половых гормонов и развитие гормонозависимых видов рака, опосредованных механизмами энтерогепатической циркуляции и деконъюгации эстрогенов.

Изучение канцерогенных механизмов действия микробиоты в организме хозяина открывает перспективы разработки новых успешных персонализированных подходов к вопросу диагностики, лечения и профилактики рака. Изменение состава микробиоты должно стать способом борьбы с онкологическими заболеваниями, наряду с хирургическим лечением, химиотерапией, лучевой терапией, таргетной терапией и иммунотерапией.

Ключевые слова: обзор, кишечная микробиота, рак, дисбактериоз, механизмы канцерогенеза, Toll-подобный рецептор, молекулярные структуры, ассоциированные с микробами, NOD-подобные рецепторы, факторы вирулентности

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

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

Для цитирования: Повещенко А.Ф., Черкас В.Н., Кабаков А.В., Казаков О.В. Кишечная микробиота и канцерогенез: актуальные аспекты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):247–260. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-356> EDN: <https://www.elibrary.ru/nkhjez>

Review
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-356>

Gut microbiota and carcinogenesis: actual aspects

Aleksandr F. Poveshchenko, Valeria N. Cherkas ✉, Aleksey V. Kabakov, Oleg V. Kazakov

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract

The microbiota, together with the host, form a symbiotic relationship in which the microbiota plays a key role in maintaining the homeostasis of the human body, performing a number of significant functions such as

energy metabolism, maturation and maintenance of the immune system, vitamin synthesis, regulation of bile acid reabsorption in the intestine, and much more. Scientific research in recent years has made a significant contribution to understanding the complex relationship between the microbiota and a range of human pathologies, including malignant neoplasms.

The review considers the mechanisms of the possible influence of bacteria on the development and progression of cancer with an emphasis on the procarcinogenic properties of the microbiota. The most important factor in the mechanism of influence of the microbiota on carcinogenesis are toxins produced by microorganisms that induce direct damage to host cell DNA, causing DNA mutations, disruption of its exact replication, and also provoke an imbalance in the proliferation and apoptosis of host cells, their rapid aging and oncogenesis. The probable mechanisms of participation of microorganisms in the development of cancer through the activation of TLRs and NLRs receptors, which have a tumor-activating effect, are considered. A brief review is given on the mechanisms of carcinogenesis associated with the metabolic activity of the microbiota due to the processes of regulation of the production of secondary bile acids, activation of pro-carcinogenic compounds: phenols, ethanol, sulfides, ammonia, nitrosamines. The influence of the microbiota on the metabolism of sex hormones and the development of hormone-dependent cancers mediated by the mechanisms of enterohepatic circulation and estrogen deconjugation is described.

The study of the carcinogenic mechanisms of action of the microbiota in the host organism opens up prospects for the development of new successful personalized approaches to the diagnosis, treatment, and prevention of cancer. Changing the composition of the microbiota should become a way to fight cancer, along with surgical treatment, chemotherapy, radiation therapy, targeted therapy and immunotherapy.

Keywords: review, gut microbiota, cancer, dysbiosis, mechanisms of carcinogenesis, Toll-like receptor (TLR), molecular structures associated with microbes (MAMPs), NOD-like receptor (NLR), virulence factors

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

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

For citation: Poveshchenko A.F., Cherkas V.N., Kabakov A.V., Kazakov O.V. Gut microbiota and carcinogenesis: actual aspects. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):247–260. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-356> EDN: <https://www.elibrary.ru/nkhjz>

Введение

Первые теории бактериально-опосредованного онкогенеза были выдвинуты в середине XX в., когда W.C. McCoy и соавт. впервые предположили связь между карциномой сигмовидной кишки и микроорганизмом рода *Enterococcus* [1]. Позднее C.L. Sears и соавт. сформулировали гипотезу «альфа-жучка», в которой микроорганизм *Bacteroides fragilis* играет центральную проонкогенную роль, вырабатывая энтеротоксины, провоцирующие возникновение колоректального рака (КРР) [2]. В 2012 г. H. Tjalsma и соавт. предложили некую модель «водитель-пассажир», в которой так называемые «бактерии-водители» типа *B. fragilis* приводят к развитию КРР, которому предшествуют несколько этапов: воспаление, повышенная клеточная пролиферация и продукция геноксинов [3]. Расширили это учение G. Hajishengallis и соавт. «ключевой гипотезой», в которой ключевые патогены, даже в малом количестве, способствуют колонизации дополнительными патогенами [4]. За этим следует сбой ответной реакции хозяина, что приводит к формированию дисбаланса комменсальной микробиоты и стимуляции воспалительного ответа [4]. Таким образом, можно сказать, что гипотеза J. Lederberg, предполагающая, что изучение микробиоты человека станет значимой темой для исследований по всему миру, в настоящее время становится всё более актуальной [5].

В пищеварительном тракте человека обитают триллионы микроорганизмов, которые первоначально были названы кишечной микробиотой [6]. Кроме этого, все поверхностные барьеры человеческого организма населены сложными сообществами бактерий, грибов, простейших, архей и вирусов. В совокупности эти микроорганизмы составляют микробиоту человека, а совокупность геномов этих микроорганизмов — микробиом человека. В недавних исследованиях показано, что соотношение бактерий к клеткам человека составляет примерно 1 : 1 [6]. Функции, кодируемые в микробиоме, играют важную роль в различных аспектах физиологии человека. Например, кишечная микробиота играет центральную роль в регуляции метаболизма хозяина, а также участвует в правильном развитии и функционировании иммунной системы [7].

В настоящее время всё больше исследований указывают на корреляцию между микробиотой человека и различными патологиями, включая нарушения обмена веществ, инфекционные заболевания, многие формы рака [8]. Триллионы микробов, населяющих организм человека, устанавливают комменсальные отношения с хозяином, но могут развиваться и дисбиотические отношения, некоторые из которых провоцируют развитие воспалительных и онкологических заболеваний [8].

Пищеварительный тракт хозяина обеспечивает питательную нишу для микробиоты, в то время как микробиота защищает макроорганизм от патогенов, помогает в развитии иммунной системы, способствует усвоению питательных веществ из пищи путём ферментации неперевариваемой клетчатки до короткоцепочечных жирных кислот, производит незаменимые аминокислоты и витамины, помогает в усвоении минералов и способствует расщеплению пищевых токсинов и канцерогенов [9]. Кишечная микробиота также способствует росту и дифференцировке энтероцитов и колоноцитов, тем самым поддерживая кишечный барьер в борьбе с потенциальными патогенами [9].

Считается, что по происхождению микробиота является фактором, наследуемым от матери при рождении [10]. На более поздних стадиях развития на микробиоту воздействует ряд зависящих (например, диета) и не зависящих (генетика, возраст) от хозяина факторов, изменяющих микробиоту соответствующим образом. Понимание динамической структуры микробиоты стало возможным с появлением современных технологий секвенирования. Указанные технологии способны полностью охарактеризовать полиморфизм бактериальных сообществ, населяющих разные локусы организма человека, с использованием нуклеотидных последовательностей генов 16S рибосомальных РНК бактерий [11]. При таком подходе в ряде исследований, к примеру, показано, что наиболее часто выделяемыми из кишечника микроорганизмами, имеющими отношение к патогенезу рака различной локализации, являются *B. fragilis*, *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *B. massiliensis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium haecii*, *Mycoplasma genitalium* [11–15].

По данным G. Trinchieri, хронические инфекции способствуют канцерогенезу, причём примерно 18% случаев возникновения рака напрямую связано с инфекционными агентами [16]. Многие патогены, официально признанные Международным агентством по изучению рака Всемирной организации здравоохранения, например вирус Эпштейна–Барр, вирус гепатита В и С, вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши, вирус иммунодефицита человека 1-го типа, вирус папилломы человека, Т-лимфотропный вирус человека типа 1, способствуют развитию рака с помощью хорошо описанных механизмов: индукции дифференцировки В-лимфоцитов, нарушения регуляции клеточного цикла и гиперактивации иммунной системы (вирус Эпштейна–Барр, вирус гепатитов В и С, вирус иммунодефицита человека), дисфункции регуляторных Т-лимфоцитов (вирус Эпштейна–Барр, Т-лимфотропный вирус человека) и прямого онкогенеза, индуцируемого вирусом герпеса, ассоциированным

с саркомой Капоши и вирусами гепатита В и С при саркоме Капоши и гепатоцеллюлярной карциноме соответственно [17, 18].

Другие патогены, такие как *Helicobacter pylori*, способствуют развитию рака, вызывая повреждение и воспаление эпителия желудочно-кишечного тракта [16]. Болезни человека связаны не только с отдельными патогенами, но и с глобальными изменениями состояния микробиоты [17]. Микробные колонии человеческого организма, объединённые в многоклеточные ассоциации, формируют самый большой «забытый» орган тела человека [16, 17] или даже некую биосоциальную систему, способную оказывать влияние на весь организм. Микробиота человека содержит метагеном, который превышает наш собственный геном в сотни раз и выполняет важнейшие функции в организме человека [16].

Традиционные методы исследования микробиоты, основанные на культивировании микроорганизмов, захватывают лишь небольшую долю, обычно менее 30%, нашей бактериальной микробиоты [19]. Культурально-независимый анализ с использованием секвенирования устранил этот пробел и сыграл важную роль в определении и понимании микробиоты и её метагенома, а также их ключевой роли в метаболизме и воспалении — двух факторах, которые способствуют развитию канцерогенеза в современном понимании [19].

Цель данного обзора литературы заключается в обобщении текущих данных, касающихся механизмов взаимодействия микробиоты с организмом человека, а также механизмов влияния микробиологического компонента на опухолевую прогрессию. В связи с этим возникла необходимость в сборе современной научной информации и гипотез о способности бактериальной микробиоты выступать индуктором онкогенеза.

Проводили анализ статей из электронных ресурсов и баз данных в National Library of Medicine (PubMed), Google Scholar, UpToDate, Science Direct и HighWire Search Results. Поиск соответствующих исследований выполнялся по расширенному перечню ключевых слов: «микробиота», «кишечная микробиота», «канцерогенез», «механизмы влияния микробиоты на канцерогенез». При этом были учтены определённые параметры: публикации за последние 10 лет, язык публикации — английский, полный бесплатный доступ к тексту статьи.

Нами найдено 1145 статей, включая метаанализы, оригинальные исследования, клинические испытания, систематические обзоры. После изучения названия публикаций, аннотаций и полных текстов статей были отобраны 34 материала. Дополнительно анализировали источники, включённые в список литературы выбранных статей. Использовали стандарты критериев включения и исключения литературных источников PRISMA [20].

Несмотря на то что список ассоциированных с онкогенезом микроорганизмов, признанный Международным агентством по изучению рака Всемирной организации здравоохранения, не обновлялся более 10 лет, недавние исследования показывают, что, помимо *H. pylori*, десятки видов бактерий могут модулировать рак или способствовать его развитию [18].

Рассмотрим основные известные механизмы возможного влияния кишечной микробиоты на канцерогенез (контактно-зависимые, иммунологические и контактно-независимые) [8]. Изучение этих механизмов имеет важное значение для диагностики, лечения и профилактики некоторых форм рака.

Контактно-зависимые механизмы влияния микробиоты на канцерогенез

Миллионы лет эволюции хозяин и окружающая его микробная среда совместно эволюционировали, создавая экосистему, в которой установлены такие отношения, как комменсализм, мутуализм и паразитизм [21]. В связи с этим невозможно игнорировать влияние бактерий на физиологические и патологические процессы, происходящие в теле человека. В частности, микробы могут стимулировать трансформацию нормальных клеток в опухолевые, влияя на геномную стабильность клеток хозяина, устойчивость клеток к апоптозу и сигнальные пути, что влечёт за собой нарушение контроля клеточной пролиферации и дифференциации клеток [22].

В процессе длительной коэволюции бактерий и человека бактериальные патогены приобрели биологические свойства, которые обеспечивают им способность противостоять защитным механизмам макроорганизма [22]. Одним из примеров является то, что бактерии для обеспечения собственной выживаемости подавляют репарации ДНК клеток организма-хозяина, способствуя выживаемости инфицированных клеток [22]. Повреждения в молекуле ДНК макроорганизма приводят к мутационным изменениям в клетках организма-хозяина и генетической нестабильности, которые являются признаками онкогенеза [22].

Некоторые виды бактерий способны повреждать ДНК клеток хозяина с помощью продукции генотоксинов [23]. Наиболее хорошо охарактеризованными генотоксинами являются колибактин, экспрессируемый штаммом *Escherichia coli*, несущей в себе группу генов *pks* («островок патогенности», а именно геномный остров поликетидсинтазы — polyketide synthase) [23] и цитолетальный растягивающий токсин (cytotolethal distending toxin — CDT), производимый рядом граммотрицательных бактерий, состоящий из 3 субчастиц: CdtA, CdtB и CdtC, которые кодируются тремя генами в составе оперона [24]. Согласно экспериментальным данным, бактерии, экспрессирующие генотоксины, генери-

руют разрывы двухцепочечной ДНК, индуцируют остановку клеточного цикла G₂/M, способствуют развитию инвазивной карциномы у мышей и часто встречаются у пациентов с КРР и воспалительными заболеваниями кишечника [25]. В другом исследовании у дефицитных по интерлейкину (ИЛ)-10 мышей, колонизированных *E. coli* или *Enterococcus faecalis*, развивалось воспаление кишечника, но лишь у животных, колонизированных *pks*⁺ *E. coli*, формировались опухоли кишечника [23].

Для проникновения колибактина внутрь требуется непосредственный контакт бактерий с клетками эпителия, а установлению лучшего контакта способствует воспаление [26]. Известно, что колибактин связывается с азотистыми основаниями в составе ДНК. Эту реакцию называют алкилированием, в ходе неё двойная спираль теряет свою форму, могут возникать сшивки между цепями и двойные разрывы [23].

Микроорганизмы, наиболее часто выделяемые при КРР, раке желудка и желчного пузыря (*E. coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus ducreyi*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter* spp.), являются продуцентами CDT [24]. Связывание цитолетального растягивающего токсина происходит на участках цитоплазматической мембраны, доставка CDT осуществляется через комплекс Гольджи и эндоплазматическую сеть, после чего он попадает в ядро, где оказывает генотоксическое действие [26]. После попадания токсина в ядро клеток хозяина он вызывает разрывы ДНК, напоминающие ответ на воздействие ионизирующим излучением, в результате происходит остановка клеточного цикла или гибель клеток [27].

Помимо генотоксинов геномную нестабильность могут вызывать метаболиты бактериального происхождения — сероводород и супероксидные радикалы. Механизм канцерогенеза, индуцируемого микробиотой, тесно связан с метаболической активностью микроорганизмов. Например, в результате воспалительного процесса, вызванного *B. fragilis*, повышается уровень каталитического фермента полиаминов оксигеносидоредуктазы, генерирующей активные формы кислорода, которые, в свою очередь, повреждают ДНК клеток хозяина, усиливая воспаление и способствуя онкогенезу [28].

E. faecalis также может генерировать большое количество внеклеточного супероксида и производные свободных форм кислорода — перекись водорода и гидроксильный радикал, которые вызывают разрывы двухцепочечной ДНК и приводят к геномной нестабильности в клетках кишечника [29]. В исследовании с использованием ПЦР в режиме реального времени для количественного определения энтеробактерий, которые потенциально связаны с риском развития КРР, сообщалось о повышен-

ной колонизации кишечника *E. faecalis* у пациентов с диагностированным КРР по сравнению со здоровыми добровольцами [25].

Сульфатредуцирующие бактерии, относящиеся в основном к классу *Fusobacteria* и *Deltaproteobacteria*, выделяют H_2S , который напрямую не повреждает ДНК, но модулирует процессы пролиферации, апоптоза и дифференциации эпителиальных клеток толстого кишечника через гиперактивацию сигнального каскада RAS–RAF–MEK–ERK и выступает как потенциально способствующий канцерогенезу агент [30]. Сигнальный путь RAS–RAF–MEK–ERK представляет собой цепь последовательно взаимодействующих белков, которые передают сигнал с поверхности клетки от клеточного рецептора внутрь ядра клетки к ДНК.

Отдельные виды бактерий продуцируют белки, которые воздействуют на сигнальные пути развития клеток хозяина, участвующие в канцерогенезе. Примером выступает сигнальный путь Wnt– β -катенин — один из основных сигнальных каскадов, нарушения в регуляции которых приводят к формированию и развитию онкологических заболеваний. β -Катенин выполняет многочисленные функции в клетке, в том числе участвует в механизмах межклеточной адгезии, клеточной подвижности и сигнальной трансдукции [31]. Как кофактор сигнального пути Wnt β -катенин задействован в процессах дифференцировки, миграции, апоптоза и пролиферации, а также сохранения пула стволовых клеток и является ключевым модулятором пролиферации и выживания опухолевых клеток, участвует в механизмах метастазирования опухолей, усиливая способность клеток к миграции и инвазии [31, 32].

Несколько ассоциированных с раком бактерий могут влиять на передачу сигналов β -катенина. Онкогенные штаммы *H. pylori* 1-го типа экспрессируют белок, ассоциированный с цитотоксином гена *A*, — CagA, который поступает непосредственно в цитоплазму клеток хозяев и aberrантно модулирует β -катенин, действует на клетки эпителия желудка и облегчает проникновение бактериальных клеток в стенки эпителия, вызывая рак желудка [33]. Данные исследований показывают, что у людей, инфицированных CagA⁺-штаммами, риск развития рака желудка вдвое превышает риск у людей, инфицированных CagA⁻-штаммами [34].

F. nucleatum модулирует сигнальный путь E-кадгерин– β -катенин. M.R. Rubinstein и соавт. продемонстрировали, что *F. nucleatum* посредством адгезии FadA связывается с эпителиальным E-кадгеринном — белком, который пронизывает клеточную мембрану и позволяет клеткам удерживаться вместе [35]. За счёт этого активируется сигнальный путь Wnt– β -катенин, что приводит к активации онкогенов, таких как *c-Myc* и *циклин D1*, индукции онкогенных и воспалительных реакций [36]. Поскольку

комплекс E-кадгерин– β -катенин регулирует клеточную адгезию, любое вмешательство в этот комплекс может привести к потере клеточной адгезии, усилению движения опухолевых клеток, инвазии и метастазированию [36].

В своём исследовании M.R. Rubinstein и соавт. отметили важность того, что высокая экспрессия гена *FadA* в ткани опухоли кишечника у человека достоверно отличается от его уровня в слизистой оболочке толстого кишечника здоровых доноров, а ингибирование этого пути, соответственно, защищает от проонкогенной активности [35].

Ещё одно исследование показало, что *F. nucleatum* в мышинной модели опухолегенеза кишечника способствовала росту множественной неоплазии кишечника. Увеличение опухолевой нагрузки сопровождалось усиленной опухолевой инфильтрацией миелиоидных клеток и экспрессией провоспалительных цитокинов [28]. Вклад *F. nucleatum* в развитие канцерогенеза может варьировать в разных экспериментальных условиях. Например, в одном исследовании клинические изоляты *F. nucleatum* с адгезинами FadA и Fap2, выделенные от больных КРР, не вызвали воспаление и рак, в то время как продуцирующая колибактин *E. coli* способствовала опухолеобразованию у мышей *Apc^{Min/+}*; *ИЛ-10^{-/-}* [28]. Различная степень колонизации *F. nucleatum* и локализация опухоли кишечника, возможно, также повлияли на клинический фенотип в этих экспериментах.

Некоторые штаммы *B. fragilis* могут вырабатывать энтеротоксин (Bft), который вызывает острую диарею и КРР [37]. Энтеротоксин Bft ускоряет эндогенное расщепление E-кадгерина, в результате чего высвобождается и активируется связанный с ним β -катенин, способствуя транскрипции протоонкогенного белка *c-Myc*, приводит к пролиферации эпителиальных клеток, секреции ИЛ-8 и повреждению ДНК [37].

Штаммы *Salmonella typhi*, вызывающие хронические инфекции, выделяют эффекторный белок AvrA, который последовательно активирует передачу сигналов β -катенина, воздействуя на пролиферацию кишечного эпителия [38]. В опытах *in vivo* у гнотобиотических мышей C57BL/6 (Taconic) при колонизации штаммом *S. typhi* AvrA⁺ на протяжении 27 нед наблюдали постоянное увеличение пролиферации в кишечнике, тогда как колонизация мутированной *S. typhi* неэкспрессирующими AvrA⁻-штаммами показала меньшую кишечную пролиферацию на протяжении всего периода исследований [38]. Таким образом, *S. typhi* оказывает хроническое влияние на модулирование сигнальных путей, связанных с пролиферацией, воспалением и онкогенезом.

Итак, важнейшим фактором механизма влияния микробиоты на канцерогенез являются токсины, продуцируемые микроорганизмами, которые вызывают прямые реакции повреждения ДНК кле-

ток хозяина, вызывая мутации ДНК, нарушения её точной репликации, а также провоцируют нарушение баланса пролиферации и апоптоза клеток хозяина, их быстрое старение, онкогенез.

Иммунологические механизмы влияния микробиоты на канцерогенез через активацию TLRs и NLRs

Индукцируемая микробиотой активация TLRs при канцерогенезе

Для распознавания микробных «образов» MAMPs (микробо-ассоциированные молекулярные паттерны, *microbe-associated molecular patterns*) в организме экспрессируются паттерн-распознающие рецепторы — Toll-подобные рецепторы (TLRs), представляющие собой интегральные трансмембранные белки I типа [39]. TLRs являются основополагающими в воспалительной передаче сигналов, опосредованной адаптерной молекулой MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*). TLRs обладают опухоль-активирующим эффектом [39]. MAMP-индуцированная активация TLRs способствует запуску окислительного стресса со стимуляцией выработки оксида азота и провоспалительных цитокинов — ИЛ-1 β , фактора некроза опухоли- α и ИЛ-6, которые стимулируют канцерогенез через NF- κ B-зависимые пути [40].

Участие TLRs, в основном TLR4 и TLR2, в канцерогенезе лучше всего продемонстрировано в клетках толстого кишечника, желудка, печени, поджелудочной железы, кожи, — органов, которые прямо или косвенно в большом количестве подвергаются воздействию поверхностных структур микроорганизмов (бактериальных лигандов TLRs, таких как липопротеин, липополисахариды, флагеллин) [41].

Учитывая вышеизложенное, можно сказать, что опухоль-стимулирующая провоспалительная активация TLRs, по-видимому, запускается бактериальными MAMPs. В то же время у гнотобионтов, наоборот, канцерогенез в желудочно-кишечном тракте и печени снижается [42].

К примеру, TLR4 — рецептор для липополисахарида клеточной стенки грамотрицательных бактерий — способствует канцерогенезу в толстой кишке, печени, поджелудочной железе и коже. Об этом свидетельствует снижение развития рака толстой кишки у мышей с истощённой кишечной микробиотой и делецией адаптерной молекулы TLR4 [43]. Данные исследования согласуются с другими исследованиями, в которых у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих TLR4 в слизистой оболочке толстого кишечника, с высокой частотой образуются колит-ассоциированные неоплазии [44].

TLR2 является рецептором для компонентов бактериальной клеточной стенки пептидогликана и липотейхоевой кислоты и способствует развитию ра-

ка желудка [45]. Высокая экспрессия TLR2 обнаружена в образцах рака желудка человека и мыши [46].

Раку желудка, опосредованному стимуляцией TLR2, способствует активация путей передачи сигналов пролиферации и выживания, включая PI3K–Akt, ERK1/2 и NF- κ B, в эпителиальном окружении опухоли [45]. При этом в генетической мышинной модели рака желудка делеция TLR2 приводит к резкому снижению опухолевой нагрузки [46].

Есть исследования, подтверждающие, что при раке лёгкого активация TLR2 приводит к опухоль-стимулирующим эффектам и способствует метастазированию [44]. Опухолевые клетки лёгких секретируют версикан — компонент внеклеточного матрикса, что приводит к версикан-опосредованной стимуляции TLR2 и продукции ИЛ-6 и фактора некроза опухоли в макрофагах и способствует метастазированию [47].

Индукцируемая микробиотой активация NLRs в канцерогенезе

К распознающим рецепторам врождённого иммунитета относят также NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors — NLRs), так называемые нуклеотид-связывающие олигомеризующие доменные (*nucleotide-binding oligomerization domain — NOD*) белки, которые функционируют в цитоплазме клеток хозяина [48].

NOD2 чувствителен к мурамилпептидным структурам клеточной стенки бактерий, в то время как NOD1 участвует в распознавании диаминопимелиновой кислоты, присутствующей в пептидогликане клеточной стенки грамотрицательных бактерий [48].

Рецепторы NOD1 и NOD2 при связывании с пептидогликаном бактерий индуцируют выработку провоспалительных цитокинов, интерферонов, а также активируют процессы аутофагии [49]. Подобно TLRs, функциональная важность NOD-сигналов была выявлена у пациентов с *pod*-мутациями, которые являются более чувствительными к хроническим заболеваниям бактериальной этиологии [49].

Генетические вариации гена, кодирующего рецептор NOD2, связаны с расстройствами пищеварения, в том числе с болезнью Крона [50]. Активация NOD2 в клетках приводит к экспрессии воспалительных цитокинов, а интенсивный воспалительный ответ может опосредовать повреждение тканей кишечника при болезни Крона [50]. На моделях мышей дефицит NOD2 приводит к увеличению случаев рака [51].

NOD2 играет ключевую роль в антибактериальном иммунитете, о чём свидетельствует повышенная восприимчивость мышей с дефицитом NOD2 к бактериальным инфекциям и сниженная способность крипт кишечника у мышей с дефицитом NOD2 подавлять комменсальные бактерии.

Известно, что мыши с отсутствием гена $NOD2^{-/-}$, а также пациенты с мутациями $NOD2$ страдают дисбактериозом кишечника, который приводит к колиту и развитию КРП [52].

Вторым паттерн-распознающим рецептором NLR, участвующим во взаимодействии хозяин–микробиота и в канцерогенезе, обусловленном бактериями, является цитозольный белок NLRP6, участвующий в регуляции апоптоза и воспаления. NLRP6 служит компонентом инфламмасом и способствует их активации. У мышей с отсутствием $NLRP6^{-/-}$ наблюдаются пониженные уровни провоспалительного цитокина ИЛ-18 [53].

Подобно мышам с $NOD2^{-/-}$, у мышей $NLRP6^{-/-}$ наблюдается дисбиоз, который делает их более восприимчивыми к развитию колита и КРП. Вызванный дисбиозом канцерогенез у мышей $NLRP6^{-/-}$ является результатом снижения активации инфламмасы и выработки ИЛ-18, о чём свидетельствует повышенная восприимчивость мышей с отсутствием $Asc^{-/-}$ (ассоциированный с апоптозом спекоподобный белок, содержащий CARD) и ИЛ-18 $^{-/-}$ к КРП и способность таких мышей передавать это заболевание мышам дикого типа в исследованиях с совместным размещением [53].

$NOD1$ играет важную роль в защите кишечника от бактерий, а дефицит $NOD1$ негативно влияет на кишечный барьер и способствует развитию воспалительных заболеваний кишечника у людей и генетически индуцированного КРП, который может быть подавлен истощением кишечной микробиоты путём антибактериальной терапии [54]. Другие NLR, такие как $NLRP3$, $NLRP12$ и NOD -, LRR - и $CARD$ -содержащие 4 ($NLRC4$), также играют роль в КРП, но их функциональный вклад в канцерогенез, обусловленный микробиотой, требует дальнейшего изучения.

Таким образом, TLRs обладают опухоль-активирующим эффектом. Например, $TLR2$ способствует развитию рака желудка, активация $TLR4$ приводит к опухоль-стимулирующим эффектам в толстой кишке, печени, поджелудочной железе и коже и способствует метастазированию. Подобно TLRs, доказана функциональная важность NOD -подобных рецепторов — пациенты с NOD -мутациями страдают дисбактериозом кишечника, который приводит к колиту и развитию КРП.

Контактно-независимые механизмы канцерогенеза, опосредованные влиянием микробиоты на некоторые этапы метаболизма хозяина

Влияние микробиоты на углеводный, белковый и липидный обмен

В 1956 г. О. Warburg выдвинул гипотезу о том, что изменённый клеточный метаболизм служит

основной причиной канцерогенеза¹, а в настоящее время метаболизм раковых клеток является многообещающей терапевтической мишенью [55]. Микробы участвуют в метаболических процессах хозяина. Микробные метаболиты или кометаболиты (образующиеся при участии как хозяина, так и микроба) могут способствовать воспалительному процессу и влиять на баланс пролиферации и гибели клеток в тканях [56]. Рассмотрение влияния метаболизма микробиоты и, в частности, микробных метаболитов, образующихся в микроокружении опухоли, на рост и распространение рака добавляет ещё один терапевтический и диагностический аспект для нацеливания на рак посредством метаболических изменений.

Бактериальный метагеном функционально гораздо более разнообразен, чем у человека, и обогащён генами, которые имеют отношение к метаболизму питательных веществ, желчных кислот и ксенобиотиков, биосинтезу витаминов и изопреноидов [19].

Кишечные бактерии регулируют метаболизм желчных кислот посредством различных гидролазных активностей, которые удаляют полярные группы — например, таурин — из конъюгированных желчных кислот, тем самым влияя на состав желчных кислот и энтерогепатическую циркуляцию и позволяя микроорганизмам использовать вторичные желчные кислоты в качестве источника энергии [57]. Недавние исследования показывают, что диета с высоким содержанием жиров изменяет микробиоту кишечника и повышает уровень вторичной желчной дезоксихолевой кислоты (DCA), которая является метаболитом, вырабатываемым исключительно бактериальным 7 α -дегидроксилированием. Примечательно, что в этой модели диеты с высоким содержанием жиров повышенный уровень DCA увеличивает развитие гепатоцеллюлярной карциномы, тогда как уменьшение количества бактерий, продуцирующих дезоксихолевую кислоту, с помощью антибиотиков снижает её [58]. Известно, что DCA способствует развитию рака толстой кишки и пищевода, что позволяет предположить, что микробиота может влиять на эти виды рака через выработку дезоксихолевой кислоты, особенно в контексте ожирения [58].

Другое исследование показало, что кластеры *Clostridium* выступают как доминирующие регуляторы продукции вторичных желчных кислот. DCA является вторичной желчной кислотой, вызывает повреждение ДНК и активизирует гепатоциты к высвобождению провоспалительных цитокинов, тем самым повышая риск развития гепатоцеллюлярной карциномы [59]. Ещё одно исследование также

¹ Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956; 123(3191):309–314. DOI: 10.1126/science.123.3191.309

подтвердило, что уменьшение количества бактерий, продуцирующих ДСА, посредством лечения антибиотиками уменьшает риски развития гепатоканцерогенеза [60].

Участие кишечной микробиоты в углеводном метаболизме отведена не последняя роль в развитии канцерогенеза кишечника. Геном человека содержит в себе потенциал для расщепления лишь небольшого количества гликанов — сахара, крахмала, лактозы, тогда как микробиота в кишечнике способна расщеплять десятки видов гликанов за счёт ферментов: гликозидгидролазы, эстеразы, гликозилтрансферазы и полисахаридлиазы [61]. Бактерии рода *Bacteroidetes* легко усваивают углеводы из пищи, поскольку обладают рядом соответствующих метаболических путей. Однако в случае углеводного голодания кишечные бактерии в качестве источника углеводов используют основной гликопротеид мукозного слоя кишечника — муцин, нарушая таким образом прилегающий к эпителиоцитам муциновый слой и способствуя развитию рака кишечника [62].

В то же время микробная ферментация углеводов может принести пользу хозяину за счёт образования короткоцепочечных жирных кислот — ацетата, бутирата, пропионата, являющихся основными энергетическими эквивалентами, продуцируемыми из пищи [61]. Ферментация белков может иметь негативные последствия из-за образования потенциально токсичных и способствующих развитию рака метаболитов: аммиака, аминов, серы, фенолов, сульфидов, нитратов, сероводорода и нитрозаминов [63]. Поскольку ферментация белка в основном происходит в дистальном отделе толстой кишки, это может способствовать более высокому уровню рака в дистальном отделе по сравнению с проксимальным отделом кишечника [63].

Диеты с высоким содержанием белка и низким содержанием углеводов могут изменить ферментацию в кишечнике, что приводит к повышению уровня опасных метаболитов, таких как нитрозамины, и к снижению уровня метаболитов, защищающих от рака, таких как бутират и фенольные соединения растительного происхождения [64]. В частности, короткоцепочечные жирные кислоты, например бутират, играют роль в регуляции воспаления и аутофагии и участвуют в защите от рака толстой кишки и печени. Полезные, антиоксидантные и противораковые свойства продуктов растительного происхождения часто приписывают фитохимическим веществам, включая полифенолы, такие как теафлавины, теарубигины, эпигаллокатехин-3-галлат и флавоноиды [65]. Благодаря своей большой ферментативной способности, микробиота синтезирует, биоконвертирует или разлагает изопrenoиды и полифенолы, контролируя таким образом их местное и системное воздействие на развитие рака [66].

Микробиота кишечника также модулирует биологическую активность лигнанов класса фитоэстрогенов, которые снижают заболеваемость раком [67].

Кишечная микробиота играет важную роль в метаболизме ксенобиотиков, кроме того, может влиять на активность и побочные эффекты лекарств, используемых для противоопухолевой терапии [68, 69]. Бактериальная β -глюкуронидаза может участвовать в деконъюгации ксенобиотиков, увеличивая время их пребывания в макроорганизме за счёт обратного поглощения через энтерогепатический путь [70].

Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод о том, что повышенное количество жиров способствует развитию гепатоцеллюлярной карциномы за счёт возрастания секреции желчи и желчных кислот в толстой кишке, а некоторые бактерии, например бактерии рода *Clostridium*, могут ускорять превращение желчной кислоты во вторичные кислоты с канцерогенным действием [71]. Микробиота в кишечнике способна расщеплять десятки видов гликанов, а при углеводном голодании кишечные бактерии в качестве источника углеводов используют муцин, нарушая прилегающий к эпителиоцитам муциновый слой и способствуя развитию рака кишечника. Также в развитии канцерогенеза немаловажная роль отведена микробной ферментации белков. Ряд таких потенциально токсичных веществ, как сера, нитраты, сероводород, аммиак, амины, фенолы, сульфиды и нитрозамины, образующиеся в результате метаболизма белков, могут привести к развитию КРР [72].

Влияние микробиоты на метаболизм половых гормонов и развитие гормонозависимых видов рака

Бактериальная микробиота может участвовать в метаболизме гормонов, включая эстрогены [73] и тестостерон [74]. В частности, микробиота модулирует энтерогепатическую циркуляцию эстрогенов благодаря способности деконъюгировать эстрогены, тем самым влияя на уровни циркулирующих и выделяемых эстрогенов и риск развития эстрогензависимых видов рака [73, 75].

Эстроген признан причинным фактором в этиологии эстрогензависимого рака молочной железы (РМЖ) и играет важную роль в инициации и стимулировании роста опухоли [75]. Более 30 лет назад D. Trichopoulos выдвинул гипотезу о том, что более высокие концентрации эстрогенов во время беременности повышают вероятность развития РМЖ у потомства спустя годы, привлекая внимание к потенциальному онкогенному значению эстрогенов [76].

В норме метаболизм эстрогенов происходит в печени, где осуществляется реакция конъюгации, т.е. присоединение к гормону глюкозы (гликозилиро-

вание) или серной кислоты (сульфатирование) [73]. Данный процесс позволяет превратить эстроген в менее активное соединение, которое может быть выведено из организма. Конъюгированный эстроген попадает вместе с желчью в кишечник.

В кишечнике бактерии, синтезирующие фермент β -глюкуронидазу, способны влиять на уровень эстрогена в крови. β -Глюкуронидазные бактерии отвечают за деконъюгацию эстрогена, что делает возможным его обратное всасывание и возвращение в кровоток, а также оставляет его в качестве биологически активного гормона. Повышенный уровень эстрогена является предрасполагающим фактором развития РМЖ. Бактерии кишечной микробиоты родов *Collinsella*, *Edwardsiella*, *Alistipes*, *Bacterioides* способны возвращать эстроген в активное состояние и увеличивать его обратное всасывание [77]. Через энтерогепатическую циркуляцию они повторно всасываются в виде свободных эстрогенов, попадая в различные органы, к примеру, молочную железу [77].

В исследованиях продемонстрировано, что ткань опухоли при люминальном типе А РМЖ (ER+) содержит более высокие уровни метаболитов эстрогена по сравнению с нормальной тканью молочной железы, что объясняется влиянием кишечной микробиоты на метаболизм и циркуляцию эстрогена, усиливающей его онкогенный потенциал [77].

Случаи относительного избытка эстрогена способствуют развитию гормонально обусловленного РМЖ у женщин в постменопаузе, что подтверждено метаанализом 9 проспективных исследований (663 женщины с РМЖ и 1765 женщин без РМЖ), демонстрирующих статистически значимую связь между уровнями эндогенных половых гормонов и РМЖ у женщин в постменопаузе [78].

В клинических исследованиях выявлена связь между микробиотой кишечника, эстрогенами и метаболитами эстрогена в моче [79].

Установлено отличие состава кишечной микробиоты в количественном и качественном отношении у пациенток, страдающих РМЖ, и здоровых женщин [80]. В исследовании «случай–контроль» В.І. Vodaі и соавт. сравнивали микробиоту кала у пациенток с недавно диагностированным РМЖ в постменопаузе и у здоровых женщин. В сравнении со здоровыми женщинами у пациенток с диагностированным РМЖ зафиксировано повышение количественного состава кишечной микробиоты, но в то же время наблюдалось снижение её качественного состава (α -разнообразия). В составе кишечной микробиоты зафиксированы высокие уровни представителей *Clostridiaceae*, *Faecalibacterium* и *Ruminococcaceae* и более низкие уровни *Dorea* и *Lachnospiraceae*, наряду с этим у онкологических пациенток наблюдался более высокий уровень эстрогенов в сыворотке крови [80].

Бактерии родов *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, напротив, способны снижать уровень эстрогена за счёт ускорения его метаболизма в макроорганизме [81]. Отмечено, что при дисбиозе микробиоты, снижении её видового разнообразия, участвующего в метаболизме стероидных гормонов, снижается уровень эстрогена в крови, с чем исследователи связывают повышенный риск развития ожирения, гиперплазии эндометрия, синдрома поликистозных яичников и гормонозависимых опухолей [82].

У лиц мужского пола представители микробиоты кишечника и мочевыводящих путей *B. massiliensis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Mycoplasma genitalium* могут повышать риск развития рака предстательной железы за счёт выработки промежуточных оксиандрогенов из глюкокортикоидов [83].

Таким образом, совокупность бактерий, населяющих желудочно-кишечный тракт, их гены, именуемые «кишечным эстроболомом», способны метаболизировать и регулировать циркулирующий в организме эстроген, тем самым влияя на канцерогенный потенциал.

Метаболическая активность микробиоты может влиять на канцерогенез, индуцируя ожирение и воспаление, метаболическую активацию и инактивацию канцерогенов, пищевых фитохимикатов, метаболизм гормонов и образование вторичных желчных кислот, способствующих развитию опухоли. Таким образом, изменённый метаболизм человека, представляющий собой, по сути, комбинацию микробной и человеческой ферментативной активности, является причиной канцерогенеза.

Заключение

Механизмы канцерогенного воздействия микробиоты на организм хозяина многообразны. Патогенные, а также симбиотические и комменсальные бактерии в организме человека могут влиять на канцерогенез путём индукции хронического воспаления, продукции генотоксинов и синтеза патологических метаболитов [84, 85]. Бактериальные токсины и метаболиты, способствующие развитию опухоли, вызывают геномную, хромосомную нестабильность и приводят к одно- и двунитиевым разрывам ДНК клеток хозяина [86, 87].

На сегодняшний день наиболее хорошо охарактеризованными генотоксинами, которые вызывают прямые реакции повреждения ДНК клеток хозяина, вызывая мутации ДНК и нарушения её точной репликации, являются колибактин, экспрессируемый штаммом *E. coli*, и цитолетальный растягивающий токсин, производимый рядом граммотрицательных бактерий (*E. coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus ducreyi*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter* spp.).

Помимо генотоксинов, разрывы двухцепочечной ДНК и геномную нестабильность, приводящую к развитию канцерогенеза, могут вызывать метаболиты бактериального происхождения — сероводород и супероксидные радикалы.

В результате анализа данных литературы обнаружены сведения, которые дополняют имеющую информацию о том, что TLRs обладают опухоль-активирующим эффектом, а взаимодействие микробиоты с TLRs может привести к развитию опухоли. Например, TLR2 способствует развитию рака желудка, активация TLR2 приводит к опухоль-стимулирующим эффектам и способствует метастазированию. Доказана функциональная важность NLRs — пациенты с NOD-мутациями страдают дисбактериозом кишечника, который приводит к колиту и способствует развитию КРР.

В развитии канцерогенеза немаловажная роль отведена микробной ферментации липидов, углеводов и белков. Так, повышенное количество жиров способствует развитию гепатоцеллюлярной карциномы за счёт возрастания секреции желчи и желчных кислот в толстой кишке. Микробиота в кишечнике способна расщеплять десятки видов гликанов, а при углеводном голодании кишечные бактерии в качестве источника углеводов используют муцин, нарушая прилегающий к эпителиоцитам муциновый слой и способствуя развитию рака кишечника. Токсичные вещества — сера, нитраты, сероводород, аммиак, амины, фенолы, сульфиды и нитрозамины, образующиеся в результате метаболизма белков, — могут привести к развитию КРР.

Кишечная микробиота модулирует энтерогепатическую циркуляцию эстрогенов благодаря способности деконъюгировать эстрогены, тем самым влияя на уровни циркулирующих и выделяемых эстрогенов и риск развития эстрогензависимых видов рака. Представители кишечной микробиоты родов *Collinsella*, *Edwardsiella*, *Alistipes*, *Bacterioides* способны возвращать эстроген в активное состояние и увеличивать его обратное всасывание, усиливая канцерогенный потенциал.

Исследования микробиоты сегодня приобретают особую актуальность, поскольку она рассматривается как диагностический онкомаркер с одной стороны и патогенетический фактор, на который направлена терапия, — с другой [88].

В дополнение к имеющейся на сегодняшний день диагностике рака, системная оценка состояния кишечной микробиоты на разных стадиях прогрессирования онкологического заболевания может открыть возможности для наблюдения за метастазированием, стратификации клинических исследований и разработки методов лечения, эффективных для конкретных групп пациентов. Действительно, в опухолях молочной железы и в местах метастазирования недавние исследования выявили нали-

чие *F. nucleatum* и усиление экспрессии её адгезина Fap2, опосредующего связывание Gal-GalNAc, сверхэкспрессируемого в РМЖ [89].

Аналогичным образом *F. nucleatum* была обнаружена в тканях кишечника и метастазах при КРР, и Y. Chen и соавт. было сделано предположение, что анаэробная бактерия способствует развитию метастазирования [90].

Перспектива изучения внутриопухолевой микробиоты может найти применение в качестве ценной модели прогнозирования выживаемости онкологических больных. Примечательно, что разнообразие микробного состава опухоли может предсказать выживаемость пациентов с резецированной аденокарциномой поджелудочной железы [91].

Анализ кишечной микробиоты также может быть использован для прогнозирования побочных реакций на иммуно- и химиотерапию рака. Например, мукозит желудочно-кишечного тракта и слизистой оболочки полости рта представляет собой серьёзное осложнение химиотерапии и напрямую связан с дисбиозом [92]. При мукозите полости рта дисбактериоз характеризуется снижением количества множественных комменсальных видов *Streptococcus* и *Prevotella* и увеличением провоспалительного *F. nucleatum*. В современном проспективном исследовании дисбиоз полости рта был дополнительно учтён при оценке проявлений мукозита полости рта у пациентов с меланомой, проходящих химиотерапию [93].

Помимо вышеупомянутого анализа состава микробиоты в качестве диагностического подхода, изучение влияния микробиоты в формировании ответа на терапию рака представляет собой один из наиболее интересных и потенциально трансляционных аспектов исследования микробиоты при опухолевых заболеваниях и может привести к оптимизации процесса принятия терапевтически значимых решений при лечении онкологических больных.

Разработка новых препаратов «прецизионных пробиотиков», обладающих оптимизированной способностью к колонизации кишечника с высокой точной ориентированностью на рак при одновременном обеспечении безопасности пациентов, представляет собой захватывающую область активных исследований [94]. Такие высокоточные пробиотические препараты потенциально могут быть адаптированы к пациенту с учётом его индивидуальных особенностей, а также анализа микробиоты и применяться в качестве вспомогательного средства для терапии рака.

Из вышесказанного можно сделать однозначный вывод о том, что диагностические, терапевтические и профилактические противоопухолевые стратегии должны учитывать ещё одного участника канцерогенеза — микробиоту человеческого организма. Изменение состава микробиоты должно

статье способом борьбы с онкологическими заболеваниями, наряду с хирургическим лечением, химиотерапией, лучевой терапией, таргетной терапией и иммунотерапией.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. McCoy W.C., Mason J.M. 3rd. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J. Med. Assoc. State Ala.* 1951;21(6):16–26.
2. Sears C.L., Pardoll D.M. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J. Infect. Dis.* 2011;203(3):306–11.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jinfdis/jiq061>
3. Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., Dutilh B.E. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10(8): 575–82.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>
4. Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10(10):717–25.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
5. Lederberg J. Infectious history. *Science.* 2000;288(5464):287–93. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.287>
6. Sampsell K., Hao D., Reimer R.A. The gut microbiota: a potential gateway to improved health outcomes in breast cancer treatment and survivorship. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(23):9239. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21239239>
7. Lu Y., Yuan X., Wang M., et al. Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. *J. Hematol. Oncol.* 2022;15(1):47.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01273-9>
8. Sepich-Poore G.D., Zitvogel L., Straussman R., et al. The microbiome and human cancer. *Science.* 2021;371(6536):eabc4552. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc4552>
9. Goma E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2020;113(12): 2019–40.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
10. Laborda-Illanes A., Sanchez-Alcoholado L., Dominguez-Reicio M.E., et al. Breast and gut microbiota action mechanisms in breast cancer pathogenesis and treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):2465.
DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12092465>
11. Liu W., Zhang R., Shu R., et al. Study of the relationship between microbiome and colorectal cancer susceptibility using 16S rRNA sequencing. *BioMed Res. Int.* 2020;2020:7828392. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7828392>
12. Salar A. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Med. Clin. (Barc.).* 2019;152(2):65–71.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.09.006>
13. Singh V., Lee G., Son H., et al. Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Front. Microbiol.* 2023;13:1103836.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1103836>
14. Rebersek M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2021;21(1):1325.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09054-2>
15. Yu L.C., Wei S.C., Ni Y.H. Impact of microbiota in colorectal carcinogenesis: lessons from experimental models. *Intest. Res.* 2018;16(3):346–57.
DOI: <https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.3.346>
16. Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* 2012;30:677–706.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075008>
17. Костин Р.К., Малюгин Д.А., Соленова Л.Г., Кулаева Е.Д. Микробиота желудочно-кишечного тракта и канцерогенез в различных органах человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023;100(1):110–125. Kostin R.K., Malyugin D.A., Solenova L.G., Kulaeva E.D. Gut microbiota and carcinogenesis in various human organs. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2023;100(1):110–125.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-310>
18. Cullin N., Azevedo Antunes C., Straussman R., et al. Microbiome and cancer. *Cancer Cell.* 2021;39(10):1317–41.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.006>
19. Forster S.C., Kumar N., Anonye B.O., et al. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. *Nat. Biotechnol.* 2019;37(2):186–92.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7>
20. Починкова П.А., Горбатова М.А., Наркевич А.Н., Гржибовский А.М. Обновленные краткие рекомендации по подготовке и представлению систематических обзоров: что нового в PRISMA-2020? *Морская медицина.* 2022;8(2):88–101. Pochinkova P.A., Gorbatova M.A., Narkevich A.N., Grjibovski A.M. Updated brief recommendations on writing and presenting systematic reviews: what's new in PRISMA-2020 guidelines? *Marine Medicine.* 2022;8(2):88–101.
DOI: <https://doi.org/10.22328/2413-5747-2022-8-2-88-101>
21. Al-Rashidi H.E. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi J. Biol. Sci.* 2022;29(3):1628–43.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.068>
22. Druzhinin V.G., Matskova L.V., Fucic A. Induction and modulation of genotoxicity by the bacteriome in mammals. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2018;776:70–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.04.002>
23. Wilson M.R., Jiang Y., Villalta P.W., et al. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science.* 2019;363(6428):eaar7785.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aar7785>
24. Lai Y.R., Chang Y.F., Ma J., et al. From DNA damage to cancer progression: potential effects of cytolethal distending toxin. *Front. Immunol.* 2021;12:760451.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760451>
25. Wang X., Huycke M.M. Colorectal cancer: role of commensal bacteria and bystander effects. *Gut Microbes.* 2015;6(6):370–6.
DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1103426>
26. Du L., Song J. Delivery, structure, and function of bacterial genotoxins. *Virulence.* 2022;13(1):1199–215.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2097417>
27. Fahrer J., Huelsenbeck J., Jaurich H., et al. Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA Repair (Amst.).* 2014;18:31–43.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.002>
28. Tilg H., Adolph T.E., Gerner R.R., Moschen A.R. The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(6):954–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.004>
29. Li S., Liu J., Zheng X., et al. Tumorigenic bacteria in colorectal cancer: mechanisms and treatments. *Cancer Biol. Med.* 2021;19(2):147–62.
DOI: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0651>
30. Ridlon J.M., Wolf P.G., Gaskins H.R. Taurocholic acid metabolism by gut microbes and colon cancer. *Gut Microbes.* 2016;7(3):201–15.
DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1150414>
31. Liu J., Zhang Y. Intratumor microbiome in cancer progression: current developments, challenges and future trends. *Biomark. Res.* 2022;10(1):37.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00381-5>
32. Pai S.G., Carneiro B.A., Mota J.M., et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J. Hematol. Oncol.* 2017;10(1):101.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>

33. Nejadi S., Karkhah A., Darvish H., et al. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. *Microb. Pathog.* 2018;117:43–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.016>
34. Park J.Y., Forman D., Waskito L.A., et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-positive infections and global variations in gastric cancer. *Toxins (Basel)*. 2018;10(4):163. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10040163>
35. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013;14:195–206. DOI: [10.1016/j.chom.2013.07.012](https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012)
36. Goma W., Al-Maghrabi H., Al-Maghrabi J. The prognostic significance of immunostaining of Wnt signalling pathway molecules, E-cadherin and β -catenin in colorectal carcinomacolorectal carcinoma. *Arab. J. Gastroenterol.* 2021;22(2):137–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajg.2021.05.001>
37. Chung L., Thiele Orberg E., Geis A.L., et al. Bacteroides fragilis toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells. *Cell Host Microbe*. 2018;23(2):203–14.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.007>
38. Lu R., Wu S., Zhang Y.G., et al. Enteric bacterial protein AvrA promotes colonic tumorigenesis and activates colonic β -catenin signaling pathway. *Oncogenesis*. 2014;3(6):e105. DOI: <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.20>
39. Keshavarz A., Pourbagheri-Sigaroodi A., Zafari P., et al. Toll-like receptors (TLRs) in cancer; with an extensive focus on TLR agonists and antagonists. *IUBMB Life*. 2021;73(1):10–25. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.2412>
40. Ray A.L., Berggren K.L., Cruz S.R., et al. Inhibition of MK2 suppresses IL- β , IL-6, and TNF- α -dependent colorectal cancer growth. *Int. J. Cancer*. 2018;142(8):1702–11. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.31191>
41. Paarnio K., Väyrynen J.P., Väyrynen S.A., et al. TLR2 and TLR4 in colorectal cancer: relationship to tumor necrosis and markers of systemic inflammation. *Neoplasia*. 2022; 69(6):1418–24. DOI: https://doi.org/10.4149/neo_2022_220509N498
42. Dajon M., Iribarren K., Cremer I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*. 2017;222(1):89–100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.06.009>
43. Li Y., Kundu P., Seow S.W., et al. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-Jun and STAT3 phosphorylation in APC-Min/+ mice. *Carcinogenesis*. 2012;33(6):1231–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs137>
44. Fukata M., Chen A., Vamadevan A.S., et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1869–81. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.008>
45. Liu Y.D., Yu L., Ying L., et al. Toll-like receptor 2 regulates metabolic reprogramming in gastric cancer via superoxide dismutase 2. *Int. J. Cancer*. 2019;144(12):3056–69. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.32060>
46. Tye H., Kennedy C.L., Najdovska M., et al. STAT3-driven up-regulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell*. 2012;22(4):466–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.010>
47. Morrissey S.M., Zhang F., Ding C., et al. Tumor-derived exosomes drive immunosuppressive macrophages in a pre-metastatic niche through glycolytic dominant metabolic reprogramming. *Cell Metab.* 2021;33(10):2040–58.e10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.002>
48. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*. 2020;30(6):492–506. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
49. Omaru N., Watanabe T., Kamata K., et al. Activation of NOD1 and NOD2 in the development of liver injury and cancer. *Front. Immunol.* 2022;13:1004439. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1004439>
50. Ashton J.J., Seaby E.G., Beattie R.M., Ennis S. NOD2 in Crohn's disease — unfinished business. *J. Crohns Colitis*. 2023;17(3):450–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjac124>
51. Couturier-Maillard A., Secher T., Rehman A., et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* 2013;123(2):700–11. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI62236>
52. Rehman A., Sina C., Gavrilova O., et al. NOD2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*. 2011;60(10):1354–62. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>
53. Hu B., Elinav E., Huber S., et al. Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013;110(24):9862–7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1307575110>
54. Meng C., Bai C., Brown T.D., et al. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018;16(1):33–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.06.002>
55. Rizzo A., Santoni M., Mollica V., et al. Microbiota and prostate cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2021;86(Pt. 3):1058–65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.09.007>
56. Chen C., Li H. The inhibitory effect of gut microbiota and its metabolites on colorectal cancer. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2020;30(11):1607–13. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.2002.02032>
57. Schoeler M., Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2019;20(4):461–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>
58. Yoshimoto S., Loo T.M., Atarashi K., et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013;499(7456):97–101. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12347>
59. Ma C., Han M., Heinrich B., et al. Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science*. 2018;360(6391):eaan5931. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aan5931>
60. Jia W., Xie G., Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;15(2):111–28. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.119>
61. Cantarel B.L., Lombard V., Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS One*. 2012;7(6):e28742. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>
62. Paone P., Cani P.D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut*. 2020;69(12):2232–43. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
63. Yang J., Yu J. The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. *Protein Cell*. 2018;9(5):474–87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0543-6>
64. Liu L., Tabung F.K., Zhang X., et al. Diets that promote colon inflammation associate with risk of colorectal carcinomas that contain *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;16(10):1622–31.e3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.04.030>
65. Kubczak M., Szustka A., Rogalińska M. Molecular targets of natural compounds with anti-cancer properties. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13659. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222413659>

66. Cueva C., Silva M., Pinillos I., et al. Interplay between dietary polyphenols and oral and gut microbiota in the development of colorectal cancer. *Nutrients*. 2020;12(3):625. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12030625>
67. Baldi S., Tristán Asensi M., Pallecchi M., et al. Interplay between lignans and gut microbiota: nutritional, functional and methodological aspects. *Molecules*. 2023;28(1):343. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28010343>
68. Nogacka A.M., Gómez-Martín M., Suárez A., et al. Xenobiotics formed during food processing: their relation with the intestinal microbiota and colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(8):2051. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20082051>
69. Lindell A.E., Zimmermann-Kogadeeva M., Patil K.R. Multimodal interactions of drugs, natural compounds and pollutants with the gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022;20(7):431–43. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00681-5>
70. Nakov R., Velikova T. Chemical metabolism of xenobiotics by gut microbiota. *Curr. Drug Metab.* 2020;21(4):260–9. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389200221666200303113830>
71. Ridlon J.M., Wolf P.G., Gaskins H.R. Taurocholic acid metabolism by gut microbes and colon cancer. *Gut Microbes*. 2016;7(3):201–15. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1150414>
72. Han S., Gao J., Zhou Q., et al. Role of intestinal flora in colorectal cancer from the metabolite perspective: a systematic review. *Cancer Manag. Res.* 2018;10:199–206. DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S153482>
73. Alpuim Costa D., Nobre J.G., Batista M.V., et al. Human microbiota and breast cancer—is there any relevant link? A literature review and new horizons toward personalised medicine. *Front. Microbiol.* 2021;12:584332. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.584332>
74. Markle J.G., Frank D.N., Mortin-Toth S., et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*. 2013;339(6123):1084–8. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1233521>
75. Parida S., Sharma D. The microbiome-estrogen connection and breast cancer risk. *Cells*. 2019;8(12):1642. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8121642>
76. Trichopoulos D. Hypothesis: does breast cancer originate in utero? *Lancet*. 1990;335(8695):939–40. DOI: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91000-z](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91000-z)
77. Rea D., Coppola G., Palma G., et al. Microbiota effects on cancer: from risks to therapies. *Oncotarget*. 2018;9(25):17915–27. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24681>
78. Kwa M., Plottel C.S., Blaser M.J., Adams S. The intestinal microbiome and estrogen receptor-positive female breast cancer. *J. Natl Cancer. Inst.* 2016;108(8):djw029. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djw029>
79. Fuhrman B.J., Feigelson H.S., Flores R., et al. Associations of the fecal microbiome with urinary estrogens and estrogen metabolites in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99(12):4632–40. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2222>
80. Fernández M.F., Reina-Pérez I., Astorga J.M., et al. Breast cancer and its relationship with the microbiota. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2018;15(8):1747. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15081747>
81. Bodai B.I., Nakata T.E. Breast cancer: lifestyle, the human gut microbiota/microbiome, and survivorship. *Perm. J.* 2020;24:19.129. DOI: <https://doi.org/10.7812/TPP/19.129>
82. Baker J.M., Al-Nakkash L., Herbst-Kralovetz M.M. Estrogen-gut microbiome axis: physiological and clinical implications. *Maturitas*. 2017;103:45–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.06.025>
83. Sha S., Ni L., Stefil M., et al. The human gastrointestinal microbiota and prostate cancer development and treatment. *Investig. Clin. Urol.* 2020;61(Suppl. 1):S43–50. DOI: <https://doi.org/10.4111/icu.2020.61.S1.S43>
84. Sánchez-Alcoholado L., Ramos-Molina B., Otero A., et al. The role of the gut microbiome in colorectal cancer development and therapy response. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1406. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12061406>
85. de Martel C., Georges D., Bray F., et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob. Health*. 2020;8(2):e180–90. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
86. Martin O.C.B., Frisan T. Bacterial genotoxin-induced DNA damage and modulation of the host immune microenvironment. *Toxins (Basel)*. 2020;12(2):63. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12020063>
87. Engstrand L., Graham D.Y. Microbiome and gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* 2020;65(3):865–73. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06101-z>
88. D'Antonio D.L., Marchetti S., Pignatelli P., et al. The onco-biome in gastroenteric and genitourinary cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(17):9664. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23179664>
89. Parhi L., Alon-Maimon T., Sol A., et al. Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. *Nat. Commun.* 2020;11(1):3259. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16967-2>
90. Chen Y., Chen Y., Zhang J., et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression. *Theranostics*. 2020;10(1):323–39. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.38870>
91. Riquelme E., Zhang Y., Zhang L., et al. Tumor microbiome diversity and composition influence pancreatic cancer outcomes. *Cell*. 2019;178(4):795–806.e12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.008>
92. Hong B.Y., Sobue T., Choquette L., et al. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. *Microbiome*. 2019;7(1):66. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0679-5>
93. Laheij A.M.G.A., Raber-Durlacher J.E., Koppelmans R.G.A., et al. Microbial changes in relation to oral mucositis in autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Sci. Rep.* 2019;9(1):16929. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53073-w>
94. Veiga P., Suez J., Derrien M., Elinav E. Moving from probiotics to precision probiotics. *Nat. Microbiol.* 2020;5(7):878–80. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0721-1>

Информация об авторах

Повещенко Александр Федорович — д.м.н., профессор, зав. отделом экспериментальной лимфологии и лаб. физиологии протективной системы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Черкас Валерия Николаевна[✉] — к.вет.н., н.с. лаб. физиологии протективной системы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия, valeriya_korol@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0380-9273>

Кабаков Алексей Васильевич — к.м.н., н.с. лаб. физиологии протективной системы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4741-6674>

Казakov Олег Васильевич — к.б.н., в.н.с. лаб. физиологии протективной системы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3947-4038>

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

Статья поступила в редакцию 07.04.2023;
принята к публикации 10.06.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Aleksandr F. Poveschenko — D. Sci. (Med.), Head, Department of experimental lymphology and laboratory of physiology of the protective system, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Valeria N. Cherkas[✉] — Cand. Sci. (Vet.), researcher, Laboratory of physiology of protective system, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0380-9273>

Aleksey V. Kabakov — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of physiology of protective system, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4741-6674>

Oleg V. Kazakov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of physiology of protective system, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3947-4038>

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

The article was submitted 07.04.2023;
accepted for publication 10.06.2023;
published 28.06.2023