

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
Российская академия наук
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов
Национальное научное общество инфекционистов
Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»



Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020

Всероссийская научно-практическая
конференция с международным участием
(6–8 октября 2020 года)

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
Российская академия наук
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов
Национальное научное общество инфекционистов
Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020

Всероссийская научно-практическая
конференция с международным участием
(6–8 октября 2020 года)

Сборник материалов

Под редакцией
академика РАН, профессора, д.м.н. В.Г. Акимкина,
профессора, д.б.н. М.Г. Твороговой

Москва
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
2020

УДК 616-078
ББК 51.94
М 75

Рецензенты: член-корреспондент РАН, проф., д.м.н. А.В. Горелов;
доц., д.м.н. А.А. Плоскирева; к.б.н. А.С. Сперанская; д.б.н., проф. М.Г. Творогова;
к.б.н. А.И. Тюменцев; к.б.н. М.А. Тюменцева, к.м.н. О.Ю. Шипулина

М 75 Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием (6–8 октября 2020 года): сборник материалов / под ред. акад. РАН, проф., д.м.н. В.Г. Акимкина, проф., д.б.н. М.Г. Твороговой. — М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. — 256 с.

ISBN 978-5-9900432-9-9

Молекулярные методы диагностики в современном мире играют важнейшую роль в обеспечении биологической безопасности в разных сферах медицины и биологии. Острыми проблемами современности по-прежнему остаются диагностика инфекционных болезней и резистентность их возбудителей к антимикробным препаратам, где все большее значение приобретает молекулярная диагностика.

В сборнике «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» представлены материалы, посвященные вопросам современной лабораторной диагностики болезней вирусной и бактериальной этиологии. Особое внимание уделено молекулярным методам, применяемым для эпидемиологического мониторинга в ходе эпидемиологических исследований. Отдельный раздел представляют материалы о лабораторной диагностике и эпидемиологических исследованиях новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Материалы предназначены для специалистов по лабораторной диагностике, эпидемиологов, микробиологов, гигиенистов, врачей-специалистов клинического профиля, сотрудников научно-исследовательских учреждений, студентов, ординаторов и аспирантов профильных специальностей.

**УДК 616-078
ББК 51.94**

ISBN 978-5-9900432-9-9

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020

**Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing
Russian Academy of Sciences
Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute for Epidemiology»
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists
National Scientific Society of Infectious Diseases
Association of Specialists and Organizations of Laboratory Service
«Federation of Laboratory Medicine»**

Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020

**Russian national scientific and practical conference
with international participation
(October, 6–8, 2020)**

Conference Proceedings

Editors:

**Vasily G. Akimkin, Full Member of the Russian Academy of Sciences,
Doctor of Sciences in Medicine, Professor;**

Maria G. Tvorogova, Doctor of Sciences in Biology, Professor

Moscow

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute for Epidemiology»

2020

Reviewers: RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) A.V. Gorelov;
Assoc. Prof., Dr. Sci. (Medicine) A.A. Ploskireva; Cand. Sci. (Biology) A.S. Speranskaya;
Professor, Dr. Sci. (Biology) M.G. Tvorogova; Cand. Sci. (Biology) A.I. Tyumentsev;
Cand. Sci. (Biology) M.A. Tyumentseva; Cand. Sci. (Medicine) O.Yu. Shipulina

Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020. Russian national scientific and practical conference with international participation (October, 6–8, 2020): Conference Proceedings / eds. RAS Full Member, Prof., Dr. Sci. (Medicine) V.G. Akimkin, Prof., Dr. Sci. (Biology) M.G. Tvorogova. — Moscow: Central Research Institute for Epidemiology, 2020. — 256 c.

ISBN 978-5-9900432-9-9

Molecular diagnostics play an essential role in the modern world in ensuring biological safety in various fields of medicine and biology. Diagnostics of infectious diseases and resistance of pathogens to antimicrobial drugs still remain acute problems of our time, while molecular diagnostics is becoming increasingly important.

«Molecular Diagnostics and Biosafety – 2020» contains materials devoted to the issues of modern laboratory diagnostics bacterial and viral infections, special attention is paid to molecular methods used for epidemiological monitoring during epidemiological investigations. A special section presents data on laboratory diagnostics and epidemiological studies of the new coronavirus infection COVID-19.

This publication is intended for specialists in laboratory diagnostics, epidemiologists, microbiologists, hygienists, clinical specialists, research fellows, students, residents and graduate students of relevant specialties.

Содержание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В КЛИНИЧЕСКИХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

АССОЦИАЦИИ ЭКСПРЕССИИ микроРНК С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ ПРЕПАРАТОМ ОЛОКИЗУМАБ <i>И.В. Буре, Д.С. Михайленко, Е.Б. Кузнецова, Е.А. Алексеева, К.В. Бондарева, М.В. Немцова</i>	18
ЧАСТОТА ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ Arg122 His ГЕНА <i>PRSS1</i> и Phe508Del ГЕНА <i>CFTR</i> ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ <i>Л.Ф. Галлямова, М.Н. Ситдикова, А.К. Имаева, А.Х. Нургалиева, Э.К. Хуснутдинова</i>	20
ДИАГНОСТИКА МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ: МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И МИКРОСКОПИЯ <i>Р.Б. Гудкова, К.К. Носкова, Ж.В. Борунова, А.С. Дорофеев, Н.А. Фадеева, Г.Г. Варванина</i>	22
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГЕПАТИТА Е В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>В.В. Давыдов, С.В. Жаворонок, Л.А. Анисько, Е.Л. Гасич, С.И. Марчук, П.А. Семижон, И.В. Потемкин, А.А. Карлсен, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов</i>	24
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Е.Г. Денисова, А.Н. Данилов, И.А. Мамонова, Т.Л. Абрамян</i>	30
РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕДРЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА НА УРОВНЕ ПЕРВИЧНОЙ МЕДИКО-САНИТАРНОЙ ПОМОЩИ <i>М.У. Дусмагамбетов, Д.К. Жунусов, А.М. Дусмагамбетова</i>	32
ВЫБОР АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ОСТРОМ ТЕЧЕНИИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА <i>Н.М. Колясникова, Г.В. Маленко, М.С. Щербинина, А.А. Ишмухаметов, В.В. Погодина</i>	34
ОБНАРУЖЕНИЕ НОРОВИРУСА 1 ГЕНОТИПА КАК ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ВСПЫШКИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ В ДЕТСКОМ УЧРЕЖДЕНИИ г. ТОМСКА <i>М.В. Кондратьев, Л.М. Кондратьева</i>	40
ОБНАРУЖЕНИЕ АЛЬФАКОРОНАВИРУСОВ, БЕТАКОРОНАВИРУСОВ И АСТРОВИРУСОВ В ФЕКАЛИЯХ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Е.В. Корнеев, А. Е. Самойлов, И.В. Артюшин, М.В. Сафонова, В.Г. Дедков, К.Ф. Хафизов, А.А. Девяткин, В.В. Каптелова, Е.В. Пимкина, А.С. Сперанская</i>	42
КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Е.А. Кошкарина, О.В. Ковалишена, Н.В. Саперкин, А.А. Каплина</i>	47
ИЗМЕНЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ ОСНОВНЫХ ПОДТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ИНФЕКЦИИ <i>Е.Н. Кудрявцева, Т.А. Семененко, М.И. Корабельникова, Я.В. Панасюк, С.Н. Кузин</i>	49
НОСИТЕЛЬСТВО ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У СОТРУДНИКОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ <i>Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, Н.К. Фурсова</i>	53

КОМПЕНСАТОРНЫЕ МУТАЦИИ В <i>groABC</i> ГЕНАХ <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> И ИХ РОЛЬ В ТРАНСМИССИИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ <i>М. Малахова, Д. Беспярых, А. Гуляев, Ю. Беспярых, Е. Шитиков.</i>	55
КОМОРБИДНОСТЬ ТУБЕРКУЛЁЗА И МИКОБАКТЕРИОЗА У БОЛЬНЫХ НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ С ИММУНОДЕФИЦИТОМ <i>В.Ю. Мишин, А.В. Мишина, А.Э. Эргешов, В.В. Романов, А.Л. Собкин.</i>	57
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК <i>M. TUBERCULOSIS</i> ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ <i>А.А. Острик, Е.Г. Салина</i>	57
ВТОРОЙ ЭТАП АКТУАЛИЗАЦИИ КАДАСТРА СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ ПУНКТОВ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ <i>К. Петремгвдлишвили, С.А. Сабурова, М.Н. Локтионова, С.Р. Раичич, В.И. Ладный, Е.Г. Симонова, Т.А. Чеканова</i>	61
МОНИТОРИНГ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ШТАММОВ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ В ПЕРИОД С 2015 ПО 2019 г. <i>О.А. Петруша, Е.Р. Корчевая, Е.Р. Мескина, И.Ю. Исаков, А.А. Никонова, Е.Б. Файзулов.</i>	63
УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОКОЛОНИЙ <i>MYCOPLASMA HOMINIS</i> <i>О.В. Побегуц, В.Г. Ладыгина, А.И. Зубов, Г.А. Лёвина, О.И. Бархатова, С.И. Ковальчук, Р.К. Зиганшин, Д.В. Евсютина, Г.Ю. Фисунов, И.В. Раковская</i>	65
ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ МЛЕКОПИТАЮЩИХ <i>Н.В. Рыбкина, Е.К. Псарева, Н.Ф. Тимченко.</i>	67
ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ВИРУСА КЕМЕРОВО НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ О ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ <i>М.В. Сафонова, Е.Г. Симонова, В.Г. Дедков</i>	69
ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ И ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕННЫХ <i>ESCHERICHIA COLI</i> <i>П.В. Слукин, Л.В. Колупаева, Н.К. Фурсова</i>	71
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> РАЗЛИЧНЫХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ГРУПП <i>Л.В. Сужаева, С.А. Егорова, М.А. Макарова</i>	73
МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫЕ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> , ВЫЗВАВШИЕ ТЯЖЕЛЫЕ ФОРМЫ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ В ОТДЕЛЕНИИ НЕЙРОРЕАНИМАЦИИ <i>Н.К. Фурсова, Е.И. Асташкин, Т.С. Новикова, Г.Н. Федюкина, О.Н. Ершова</i>	79
ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РИККЕТСИОЗОВ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ТИПИЧНЫМИ И АТИПИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ <i>Т.А. Чеканова</i>	81
ЗНАЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК ЦМВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИИ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ <i>В.И. Шахильдян, М.С. Ядрихинская, А.А. Орловский, О.Ю. Шипулина, Э.А. Домонова, Е.Б. Яровая.</i>	85

ГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЗАВИСИМОСТИ

КОНСТРУИРОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ЧУМНЫХ ВАКЦИН

А.П. Анисимов, М.Е. Платонов, С.В. Дентовская 91

ПЕРВОЕ ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ХРОМОСОМНО-ИНТЕГРИРОВАННОГО HUMAN BETAHERPES VIRUS 6B, ПЕРЕДАВАЕМОГО ПО НАСЛЕДСТВУ, В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Э.А. Домонова, К.В. Кулешов, И.А. Гоптарь, А.В. Никифорова, О.Ю. Сильвейстрова, О.Ю. Шипулина 93

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПРИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПРИЧИН ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ ПАЦИЕНТОВ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

Л.Г. Кудрявцева, В.И. Сергеев 96

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОТОВЫХ КОМПЛЕКСОВ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

Ю.В. Михайлова, М.А. Тюменцева, А.А. Шеленков, Ю.Г. Янушевич, А.И. Тюменцев, В.Г. Акимкин 98

АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЙ НАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В СКОТОВОДСТВЕ И СВИНОВОДСТВЕ С ПОЗИЦИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ МОЛОДНЯКА В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

А.М. Нагорных, А.И. Тюменцев, М.А. Тюменцева, В.Г. Акимкин 104

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОФИЛЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕТОДОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ

М.И. Терехова, Е.В. Розачева, И.А. Деревянченко, Л.А. Краева 109

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКОВ, ОЧИЩЕННЫХ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ, НА ПРИМЕРЕ НУКЛЕАЗ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

А.И. Тюменцев, М.А. Тюменцева, В.Г. Акимкин 113

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОВИРУСНОЙ ДНК ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА (ВИЧ-1), ИНТЕГРИРОВАННОЙ В ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА, В УЛЬТРАНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

М.А. Тюменцева, А.И. Тюменцев, В.Г. Акимкин 118

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО И НИЗКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.Б. Файзулов, А.Н. Каира, Т.Р. Узбеков, А.А. Поромов, Е.А. Волынская, О.А. Свитич, В.В. Зверев 123

COVID-19: ЛАБОРАТОРНЫЕ, КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ, НАПРАВЛЕННОГО НА ПРОФИЛАКТИКУ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРОСА МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ И ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ

В.В. Беляева, Н.В. Козырина, У.А. Куимова, М.Д. Голиусова, А.Н. Наркевич 125

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ COVID-19 НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

С.А. Бугоркова, Е.А. Чумачкова, А.Л. Кравцов, С.А. Портенко, В.А. Кожевников, А.Ю. Гончарова, Е.В. Найденова, О.В. Кедрова, Е.С. Казакова, С.А. Щербакова 127

НАБОР РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК SARS-COV-2 <i>Е.А. Гончарова, А.С. Долгова, И.С. Кассиров, А.П. Луч, В.Г. Дедков</i>	131
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ COVID-19 В ПЕРИОД С 10 МАРТА ПО 17 АВГУСТА 2020 г. <i>Д.В. Дубоделов, В.В. Клушкина, Н.С. Чурилова, Я.В. Панасюк, Н.В. Власенко, С.Н. Кузин</i>	133
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА COVID-19 В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ В ПЕРИОД С 19 МАРТА ПО 12 АВГУСТА 2020 г. <i>Д.В. Дубоделов, В.В. Клушкина, Н.С. Чурилова, Я.В. Панасюк, Н.В. Власенко, С.Н. Кузин</i>	138
ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА К ВИРУСУ SARS-COV-2 СРЕДИ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН С РАЗЛИЧНЫМ РИСКОМ ИНФЕКЦИИ COVID-19 <i>Г.Ш. Исаева, И.Д. Решетникова, Е.В. Агафонова, Ю.А. Тюрин, С.Н. Куликов, Г.Ф. Гилязутдинова, Д.В. Лопушов, В.Б. Зиатдинов</i>	143
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА N SARS-COV-2 ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИФА <i>И.С. Кассиров, Е.А. Гончарова, Е.В. Зуева, А.С. Долгова</i>	145
МУТАЦИИ В ГЕНОМАХ SARS-COV-2 БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В КОНЦЕ МАРТА–НАЧАЛЕ АПРЕЛЯ, ОТ ПАЦИЕНТОВ ГОРОДА МОСКВЫ <i>В.В. Каптелова, А.С. Сперанская, А.Е. Самойлов, А.В. Валдохина, В.П. Буланенко, Е.В. Корнеев, О.Ю. Шипулина, В.Г. Акимкин</i>	147
РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ SARS-COV-2 И ДРУГИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ МЕТОДОМ ПЦР В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ В АПРЕЛЕ–ИЮЛЕ 2020 г. <i>А.Н. Косырева, И.В. Бакштановская, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова, Е.А. Зматракова, А.З. Бартусевич, С.А. Леонтьева, А.О. Вишнякова, Ц.А. Панина</i>	153
РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ ВНЕШНЕГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ COVID-19 <i>Н.И. Мезенцева, С.В. Лаптев</i>	155
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2, ПРИ АУТОПСИИ <i>Н.В. Мозгалёва, П.А. Ведяпин, Ю.Г. Пархоменко</i>	157
ДИНАМИКА АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ АНТИГЕНАМ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 У БОЛЬНЫХ С ПОДТВЕРЖДЁННОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19 <i>Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева, А.В. Алешкин, С.Ю. Комбарова, О.Э. Карпов, А.А. Пулин, О.А. Орлова, Ю.С. Лебедин, А.М. Воробьев, Э.Р. Мехтиев</i>	159
ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО COVID-19 В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В ПЕРИОД С 26 ФЕВРАЛЯ 2020 г. ПО 22 ИЮЛЯ 2020 г. <i>Я.В. Панасюк, Н.С. Чурилова, Н.В. Власенко, Д.В. Дубоделов, В.В. Клушкина, С.Н. Кузин</i>	165
ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ SARS-CoV-2 В ФЕКАЛИЯХ ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ДИАРЕЯМИ В ДЕБЮТЕ ЭПИДЕМИИ COVID-19 <i>Н.В. Паркина, Т.А. Коновалова, З.Х. Далелова, Т.А. Кожаметова, С.Б. Яцышина, А.Т. Подколзин</i>	168

РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ IgG К SARS-COV-2 СОТРУДНИКОВ МЕДИЦИНСКОГО ЦЕНТРА <i>Н.В. Северская, И.В. Чеботарева, Н.Г. Минаева, Н.Е. Щербакова, С.А. Иванов</i>	171
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ИНФЕКЦИОННЫХ ЧАСТИЦ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 <i>И.Г. Сивов, И.С. Фирсов</i>	173
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ COVID-19 В ПЕРИОД МАКСИМАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПАНДЕМИИ НА ПРИМЕРЕ ОДНОГО ИЗ ИНФЕКЦИОННЫХ СТАЦИОНАРОВ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Т.В. Сташко</i>	176
ОПРЕДЕЛЕНИЕ IgM и IgG АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-COV-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ <i>А.П. Топтыгина, Л.И. Новикова, М.А. Смердова, С.С. Бочкарева, А.В. Алешкин</i>	178
ФОРМИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К SARS-COV-2 В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ <i>Т.А. Чеканова, В.Г. Акимкин, А.В. Каленская, Т.В. Тыргина, Е.В. Тиванова</i>	180
ОСОБЕННОСТИ РОСТА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19, ОРВИ, ГРИППОМ И ПНЕВМОНИЕЙ В РОССИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИМАТО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ПЛОТНОСТИ НАСЕЛЕНИЯ <i>Н.Ю. Пшеничная, И.А. Лизинфельд, Г.Ю. Журавлев, Н.С. Морозова</i>	184
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ПАЦИЕНТОВ г. САРАТОВА И САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Е.А. Чумачкова, С.А. Портенко, Е.С. Казакова, О.В. Кедрова, С.А. Щербакова, Т.Л. Вознюк, И.И. Крупинская, Р.Н. Стешенко</i>	186
ИЗМЕНЧИВОСТЬ SARS-COV2 КАК ФАКТОР ПОТЕРИ КОНТРОЛЯ НАД РАСПРОСТРАНЕНИЕМ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ <i>А.О. Якимова, И.В. Чеботарёва, Д.Ю. Кирюшина, И.Л. Ершова, Л.В. Любина, Н.М. Липунов, Г.П. Безяева, Л.В. Панарина, В.И. Киселёва</i>	192
МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	
ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССОВ M И G К SARS-COV-2 <i>Ю.А. Акиншина, С.С. Марданлы</i>	194
РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ <i>RRS</i> , АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА К АМИНОГЛИКОЗИДАМ <i>А.В. Бородулин, Т.А. Бондаренко, В.В. Борунова, Р.И. Луданный</i>	196
РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ <i>rpsL</i> , АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА К СТРЕПТОМИЦИНУ <i>В.В. Борунова, А.В. Бородулин, Т.А. Бондаренко, Р.И. Луданный</i>	198
МОНИТОРИНГ АНТИ-SARS-CoV-2 АНТИТЕЛ У КОНТАКТНЫХ ЛИЦ ДО И ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ КРОВИ В ПРОБИРКАХ СМАРТЮБ <i>Р.А. Бурханов, Л.В. Черкасова, Р.О. Темирлиева, Ю.А. Астраханцев, А.П. Лапко, А.И. Видрак, В.В. Сорвачев, Д.Е. Меламед, Е.В. Кравченко</i>	200

ДНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА МАРБУРГ, СОДЕРЖАЩАЯ ОСНОВНЫЕ АНТИГЕНЫ ПАТОГЕНА <i>Н.В. Волкова, А.А. Исаева, О.С. Таранов, Е.И. Казачинская, Д.Н. Щербаков</i>	202
АПРОБАЦИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВГЧ-6А И ВГЧ-6В НА ПАНЕЛИ КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ <i>А.А. Вязовая, Э.А. Домонова, А.В. Лисок, О.Ю. Сильвейстрова, М.А. Никольский, В.Е. Ведерников, О.В. Нарвская</i>	204
ПОДЛИННОСТЬ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1b: РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ <i>Е.О. Голощапова, А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова</i>	207
РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ NS1 БЕЛКА ВИРУСА ДЕНГЕ <i>И.С. Кассиров, А.С. Долгова</i>	209
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ <i>M. LEPRAE</i> В КАЧЕСТВЕ СЕРОДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ <i>А. Г. Королёва-Ушакова, Е.А. Панфёров, Е. В. Баранова, А.А. Горбатов, С.Ф. Бикетов</i>	211
КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОГО И АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ПОДТИПОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА <i>В.И. Корчагин, О.П. Дрибноходова, К.О. Миронов</i>	212
ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА НА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ПАНЕЛИ ОБРАЗЦОВ ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА <i>И.С. Литая, М.В. Альварес Фигероа, А.А. Казюлина, Л.В. Домотенко</i>	216
МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЦР <i>К.А. Осянин, К.В. Усольцев, Д.А. Миргазов, Л.И. Зайнуллин</i>	221
НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЁЗА ИЗ ГРУППЫ СПЕКТРООБРАЗУЮЩИХ МОЛЕКУЛ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ ПРИ ЛИНЕЙНОЙ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ <i>И.А. Рябинин, Н.В. Васильева</i>	223
РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЁТА РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА И СЕРОМОНИТОРИНГА ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ <i>П.В. Филатов, А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, Н.Д. Ушкаленко, К.С. Кунгурцев, А.К. Гунгер</i>	225
ДРУГОЕ	
НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИЯМИ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ <i>Н.А. Аникеева, С.В. Терещенко, С.С. Кантутис, Н.А. Садомская, А.В. Несина, Н.А. Майорова, А.Ю. Лашко, Т.В. Крыгина</i>	227
РОЛЬ ПЕРЕПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ В СНИЖЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГОНОКОККА К АНТИБИОТИКАМ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ <i>И.Н. Бодоев, М.В. Малахова, О.В. Побегуц, И.О. Бутенко, А.И. Манолов, И. Алтухов, В.Г. Згода, Е.Н. Ильина, В.М. Говорун</i>	229

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ КЛАССА ИНТЕРНАЛИНОВ, У ШТАММОВ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> <i>Т.В. Илларионова, Е.К. Псарева, Е.А. Потемкин, С.А. Ермолаева</i>	231
РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , СОДЕРЖАЩИЕ АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ИНТЕРНАЛИН А <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> <i>Ю.С. Кокурина, Е.К. Псарева, Я.М. Чаленко, С.А. Ермолаева</i>	233
ВОЗРАСТАНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ НЕПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА H5N3 ПРИ АДАПТАЦИИ К МЫШАМ <i>Н.Ф. Ломакина, Т.А. Тимофеева, И.А. Руднева, А.В. Ляшко, О.Л. Воронина, Е.И. Аксёнова, Н.Н. Рыжова, М.С. Кунда, А.А. Трещалина, А.С. Гамбарян</i>	235
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ И КОНТРОЛЬ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В СОМАТИЧЕСКИХ СТАЦИОНАРАХ <i>Т.А. Семененко, Э.В. Жукова, Т.П. Говтянская, А.А. Бурова</i>	237
ВИРУЛЕНТНОСТЬ УРОПАТОГЕННЫХ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , НЕСУЩИХ ГЕНЫ <i>hlyA</i> И <i>cnf1</i> , ДЛЯ ЛИЧИНОК <i>GALLERIA MELLONELLA</i> <i>П.В. Слукин, Л.В. Колупаева, Н.А. Слукина, Н.Н. Подгорная, Н.К. Фурсова</i>	241
МОНИТОРИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДИРОФИЛЯРИОЗА И ТУЛЯРЕМИИ В КОМАРАХ МЕТОДОМ ПЦР НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ <i>О.Ю. Старостина, Г.В. Берёзкина, Т.С. Рязанова, С.Ю. Зеликман, А.В. Свердлова, В.В. Якименко, А.Х. Нурпейсова</i>	243
ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА <i>Т.Н. Суборова, С.А. Свистунов, А.А. Кузин, О.П. Сидельникова</i>	245
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВИРУСА ЯЩУРА <i>Н.И. Хаммадов, А.И. Хамидуллина, К.В. Усольцев, Т.Х. Фаизов</i>	247
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОЛИМФЫ И ТОТАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ КЛЕЩЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ НА НАЛИЧИЕ ДНК РИККЕТСИЙ <i>С.В. Штрек, И.Е. Самойленко, Г.В. Берёзкина</i>	249
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЕВРОПЕЙСКОГО ЛИССАВИРУСА ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ 1-го ТИПА, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ ЛЕТУЧЕЙ МЫШИ ВИДА <i>ERTESICUS SEROTINUS</i> , ПОЙМАННОЙ В ОКРЕСТНОСТЯХ г. ВОРОНЕЖ В КОНЦЕ 2019 г. <i>А.С. Сперанская, А.Е. Самойлов, В.В. Каптелова, И.В. Артюшин, Е.Г. Симонова, А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин, Т.В. Степанова, В.В. Стаффорд, А.В. Паршикова, В.Г. Дедков</i>	251
ОЦЕНКА НАЛИЧИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГМО В ПЫЛЬЦЕ, СОБИРАЕМОЙ ПЧЁЛАМИ <i>К.А. Осянин, А.Р. Макаева, Д.А. Миргазов, И.А. Елизарова</i>	253

Table of Contents

MOLECULAR DIAGNOSTICS IN CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

ASSOCIATIONS BETWEEN miRNA EXPRESSION IN RUSSIAN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND EFFICIENCY OF OLOKIZUMAB TREATMENT <i>I.V. Bure, D.S. Mikhaylenko, E.B. Kuznetsova, E.A. Alekseeva, K.V. Bondareva, M.V. Nemtsova</i>	18
FREQUENCY OF Arg122His GENETIC MUTATIONS OF THE <i>PRSS1</i> GENE AND Phe508Del OF THE <i>CFTR</i> GENE IN ACUTE PANCREATITIS <i>L.F. Gallyamova, M.N. Sitdikova, A.K. Imaeva, A.K. Nurgalieva, E.K. Khusnutdinova</i>	20
MYCOBACTERIAL INFECTIONS DIAGNOSTICS: MOLECULAR AND MICROSCOPY RESEARCHES <i>Gudkova R.B., Noskova K.K., Borunova Z.V., Dorofeev A.S., Fadeeva N.A., Varvanina G.G.</i>	22
MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS E IN THE REPUBLIC OF BELARUS <i>V.V. Davydov, S.V. Zhavoronok, L.A. Anisko, E.L. Gasich, S.I. Marchuk, P.A. Semizhon, I.V. Potemkin, A.A. Karlsen, K.K. Kyuregyan, M.I. Mikhailov</i>	24
MOLECULAR RESEARCH METHODS IN THE EARLY DIAGNOSIS OF HIV INFECTION IN CHILDREN IN SARATOV OBLAST <i>E.G. Denisova, A.N. Danilov, I.A. Mamonova, T.L. Abramyan</i>	30
RESULTS OF THE IMPLEMENTATION OF THE MOLECULAR-METHOD IN THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS AT THE LEVEL OF PRIMARY HEALTHCARE <i>M.U. Dusmagambetov, D.K. Zhunusov, A.M. Dusmagambetova</i>	32
CHOOSING OF ANTIBIOTICS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS IN THE ACUTE COURSE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS <i>N.M. Kolyasnikova, G.V. Malenko, M.S. Shcherbinina, A.A. Ishmuhametov, V.V. Pogodina</i>	34
DETECTION OF NOROVIRUS GENOTYPE 1 AS AN ETIOLOGICAL FACTOR IN INVESTIGATION OF ACUTE INTESTINAL INFECTION OUTBREAK IN A CHILDREN'S INSTITUTION IN TOMSK <i>M.B. Kondratev, L.M. Kondrateva</i>	40
DETECTION OF ALFACORONAVIRUSES, BETACORONAVIRUSES AND ASTROVIRUSES IN BAT FECAL SAMPLES FROM MOSCOW REGION <i>E.V. Korneenko, A.E. Samoilov, I.V. Artyushin, M.V. Safonova, V.G. Dedkov, K.F. Khafizov, A.A. Deviatkin, E.V. Pimkina, A.S. Speranskaya</i>	42
CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND ETIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN HOSPITALIZED CHILDREN IN NIZHNY NOVGOROD OBLAST <i>E.A. Koshkarina, O.V. Kovalishena, N.V. Saperkin, A.A. Kaplina</i>	47
THE IMPORTANCE OF ANTI-HCV SCREENING IN PATIENTS OF LARGE MULTIFIELD HOSPITALS <i>E.N. Kudrjavitseva, M.I. Korabelnikova, T.A. Semenenko, Ya.V. Panasyuk, S.N. Kuzin</i>	49
CARRIAGE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA AND ANTIBACTERIAL RESISTANCE GENES OF MICROBIOLOGY LABORATORY STAFF <i>E.S. Kuzina, T.S. Novikova, N.K. Fursova</i>	53
COMPENSATORY MUTATIONS IN THE <i>rpoABC</i> GENES OF <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> AND THEIR ROLE IN THE TRANSMISSION OF DRUG RESISTANT FORMS <i>M. Malakhova, D. Bespyatykh, A. Guliaev, J. Bespyatykh, E. Shitikov</i>	55
THE COMORBIDITY OF TUBERCULOSIS AND MYCOBACTERIOSIS AT ADVANCED STAGES OF HIV INFECTION WITH IMMUNODEFICIENCY <i>V.Y. Mishin, A.V. Mishina, A.E. Ergeshov, V.V. Romanov, A.L. Sobkin</i>	57

PERSPECTIVES OF USE <i>M. TUBERCULOSIS</i> SMALL NONCODING RNAS FOR TUBERCULOSIS INFECTION DIAGNOSTICS	
A.A. Ostriak, E.G. Salina	59
THE SECOND STAGE OF UPDATING THE INVENTORY OF STATIONALLY ADVERSE POINTS FOR ANTHRAX IN THE NORTH-WESTERN FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION	
K. Petremgvdlishvili, S.A. Saburova, M.N. Loktionova, S.R. Raichich, V.I. Ladnyi, E.G. Simonova ² , T.A. Chekanova	61
MONITORING OF CHANGES IN THE GENETIC STRUCTURE OF ROTAVIRUS STRAINS CIRCULATING IN THE MOSCOW REGION FROM 2015 TO 2019	
O. A. Petrusha, E.R. Korchevaya, E.P. Meskina, I.I. Isakov, A.A. Nikonova, E.B. Faizuloev	63
ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PROTEOMIC ANALYSIS OF MICROCOLONIES <i>MYCOPLASMA HOMINIS</i>	
O.V. Pobeguts, V.G. Ladygina, A.I. Zubov, G.A. Levina, O.I. Barhatova, S.I. Kovalchuk, R.K. Ziganshin, D.V. Evsyutina, G.Yu. Fisunov, I.V. Rakovskaya	65
STUDY OF PATHOGENICITY FACTORS OF <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> STRAINS ISOLATED FROM MAMMALS	
N. V. Rybkina, E. K. Psareva, N. F. Timchenko	67
KEMEROVO VIRUS EPIDEMIC POTENTIAL ESTIMATION BASED ON ITS GENETIC DIVERSITY	
M.V. Safonova, E.G. Simonova, V.G. Dedkov	69
PATHOGENICITY ISLANDS AND VIRULENCE GENES OF UROPATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i>	
P.V. Slukin, L.V. Kolupaeva, N.K. Fursova	71
ANTIBIOTIC RESISTANCE OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> OF DIFFERENT PHYLOGENETIC GROUPS	
L.V. Suzhaeva, S.A. Egorova, M.A. Makarova	73
MULTIDRUG-RESISTANT <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> CAUSED SEVERE INFECTIONS IN THE NEURO-ICU	
N.K. Fursova, E.I. Astashkin, T.S. Novikova, G.N. Fedyukina, O.N. Ershova	79
LABORATORY CONFIRMATION OF THE SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIOSSES AMONG PATIENTS WITH TYPICAL AND ATYPICAL CLINICAL MANIFESTATIONS	
Chekanova T.A.	81
CYTOMEGALOVIRUS DNA CONCENTRATION IN BIOLOGICAL SAMPLES AS A KEY TO THE DIAGNOSIS OF CMV PNEUMONIA IN HIV-INFECTED PATIENTS	
V.I. Shakhgildyan, M.S. Yadrikhinskaya, A.A. Orlovsky, O.Y. Shipulina, E.A. Domonova, E.B. Yarovaya	85
GENOMIC STUDIES FOR BIOSAFETY AND TECHNOLOGICAL SELF-SUFFICIENCY	
CONSTRUCTION OF MODERN PLAGUE VACCINES	
A.P. Anisimov, M. E. Platonov, S. V. Dentovskaya.	91
FIRST WHOLE GENOME SEQUENCE OF INHERITED CHROMOSOMALLY INTEGRATED HUMAN BETAHERPES VIRUS 6B IN RUSSIA	
E.A. Domonova, K.V. Kuleshov, I.A. Goptar, A.V. Nikiforova, O.Y. Silvestrova, O.Y. Shipulina	93
APPLICATION OF PATHOGEN GENETIC TYPING IN THE EPIDEMIOLOGICAL DIAGNOSIS GROUP MORBIDITY CAUSES PURULENT-SEPTIC INFECTIONS IN CARDIAC SURGERY HOSPITAL PATIENTS	
L.G. Kudryavtseva, V.I. Sergevnin.	96
ASSESSMENT OF EFFICIENCY AND OFF-TARGET ACTIVITY OF CRISPR/CAS RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES	
Y.V. Mikhaylova, M.A. Tyumentseva, A.A. Shelenkov, Y.G. Yanushevich, A.I. Tyumentsev, V.G. Akimkin.	98

ANALYSIS OF PROMISING OPPORTUNITIES FOR THE USE OF GENOME EDITING TECHNOLOGIES IN CATTLE AND PIG INDUSTRY IN TERMS OF SURVIVAL OF YOUNG ANIMALS IN THE NEONATAL PERIOD <i>A.M. Nagornyykh, A.I. Tyumentsev, M.A. Tyumentseva, V.G. Akimkin.</i>	104
WHOLE-GENOME SEQUENCING-BASED ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> STRAINS FROM SAINT-PETERSBURG AND THE VOLOGDA REGION <i>M.I. Terekhova, E.V. Rogacheva, I.A. Derevyanchenko, L.A. Kraeva.</i>	109
DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR ENDOTOXIN REMOVAL FROM PROTEIN PREPARATIONS ON THE EXAMPLE OF NUCLEASES OF THE CRISPR/CAS SYSTEM <i>A.I. Tyumentsev, M.A. Tyumentseva, V.G. Akimkin</i>	113
DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR DETECTION OF GENOME-INTEGRATED PROVIRAL DNA OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV-1) IN ULTRA LOW CONCENTRATIONS USING THE CRISPR/CAS SYSTEM <i>M.A. Tyumentseva, A.I. Tyumentsev, V.G. Akimkin</i>	118
GENETIC STRUCTURE OF HIGH- AND LOW-RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUSES CIRCULATING IN THE RUSSIAN FEDERATION <i>E.B. Faizuloev, A.N. Kaira, T.R. Uzbekov, A.A. Poromov, E.A. Volynskaya, O.A. Svitich, V.V. Zverev</i>	123
COVID-19: LABORATORY, CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL STUDIES	
BEHAVIOURAL PATTERNS FOR PROPHYLAXIS OF COVID-19: SURVEY OF MEDICAL PROFESSIONALS AND AIDS PATIENTS <i>V.V. Belyaeva, N.V. Kozyrina, U.A. Kuimova, M.D. Goliusova, A.N. Narkevich</i>	125
IMMUNOLOGICAL DISORDERS IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA DURING THE COVID-19 EPIDEMIC IN THE SARATOV OBLAST <i>S.A. Bugorkova, E.A. Chumachkova, A.L. Kravtsov, S.A. Portenko, V.A. Kozhevnikov, A.Yu. Goncharova, E.V. Naidenova, O.V. Kedrova, E.S. Kazakova, S.A. Shcherbakova</i>	127
ONE-STEP QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR RNA SARS-COV-2 DETECTION <i>E.A. Goncharova, A.S. Dolgova, I.S. Kassirov, A.P. Luch, V.G. Dedkov.</i>	131
EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COVID-19 INCIDENCE IN THE POPULATION OF KRASNODAR KRAI IN THE PERIOD FROM MARCH 10 TO AUGUST 17, 2020 <i>D.V. Dubodelov, V.V. Klushkina, N.S. Churilova, I.A. V. Panasiuk, N.V. Vlasenko, S.N. Kuzin</i>	133
EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COVID-19 CASES IN THE STAVROPOL KRAI DURING MARCH 19, 2020 TO AUGUST 12, 2020 <i>D.V. Dubodelov, V.V. Klushkina, N.S. Churilova, I.A. V. Panasiuk, N.V. Vlasenko, S.N. Kuzin</i>	138
ASSESSMENT OF THE IMMUNE RESPONSE INTENSITY TO SARS-CoV-2 VIRUS AMONG MEDICAL WORKERS WITH VARIED RISKS OF COVID-19 INFECTION IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN <i>G.S. Isaeva, I.D. Reshetnikova, E.V. Agafonova, Y.A. Tyurin, S.N. Kulikov, G.F. Gilyazutdinova, D.V. Lopushov, V.B. Ziatdinov</i>	143
PRODUCTION OF THE RECOMBINANT SARS-COV-2 N PROTEIN FOR ELISA-BASED DIAGNOSTIC SYSTEMS <i>I.S. Kassirov, E.A. Goncharova, E.V. Zueva, A.S. Dolgova.</i>	145
MUTATIONS IN THE GENOMES OF SARS-COV-2 FROM CLINICAL SAMPLES OBTAINED IN LATE MARCH-EARLY APRIL FROM PATIENTS IN MOSCOW <i>V.V. Kaptelova, A.S. Speranskaya, A.E. Samoilov, A.V. Valdokhina, V.P. Bulanenko, E.V. Korneenko, O.Y. Shipulina, V.G. Akimkin</i>	147

RESULTS OF DETECTING SARS-COV-2 AND OTHER PATHOGENS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA BY PCR IN THE TYUMEN OBLAST IN APRILE–JULY 2020 <i>A.N. Kosyreva, I.V. Bakshantovskaya, T.F. Stepanova, E.A. Zmatrakova, A.Z. Bartusevich, S.A. Leonteva, A.O. Vishnyakova, C.A. Panina.</i>	153
PROGRAM DEVELOPMENT AND ORGANIZATION OF EXTERNAL QUALITY CONTROL OVER COVID-19 LABORATORY DIAGNOSTICS <i>N.I. Mezentsseva, S.V. Laptev</i>	155
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC VERIFICATION OF CORONAVIRUS INFECTION COVID-19 DURING AUTOPSY <i>N.V. Mozgaleva, P.A. Vedyapin, Yu.G. Parkhomenko</i>	157
DYNAMICS OF ANTIBODIES TO VARIOUS ANTIGENS OF THE SARS-COV-2 CORONAVIRUS IN PATIENTS WITH CONFIRMED COVID-19 INFECTION <i>L.I. Novikova, S.S. Bochkareva, A.V. Aleshkin, S.IU. Kombarova, O.E. Karpov, A.A. Pulin, O.A. Orlova, I.U.S. Lebedin, A.M. Vorobev, E.R. Mekhtiev.</i>	159
EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COVID-19 IN NIZHNY NOVGOROD OBLAST DURING FEBRUARY 26, 2020 TO JULY 22, 2020 <i>Ia.V. Panasiuk, N.S. Churilova, N.V. Vlasenko, D.V. Dubodelov, V.V. Klushkina, S.N. Kuzin</i>	165
THE PREVALENCE OF SARS-CoV-2 IN STOOL SAMPLES FROM CHILDREN WITH DIARRHEAL INFECTIONS IN THE DEBUT OF THE COVID-19 EPIDEMIC IN THE RUSSIAN FEDERATION <i>N.V. Parkina, T.A. Konovalova, Z.K. Dalelova, T.A. Kozhakhmetova, S.B. Yatsyshina, A.T. Podkolzin</i>	168
RESULTS OF TESTING SARS-COV-2 IgG ANTIBODIES AMONG THE MEDICAL CENTER EMPLOYEES <i>N.V. Severskaya, I.V. Chebotareva, N.G. Minaeva., N.E. Scherbakova, S. A. Ivanov.</i>	171
FLECK QUANTIFICATION OF THE NUMBER OF INFECTIOUS SARS-COV-2 CORONAVIRUS PARTICLES <i>I.G. Sivov, I.S. Firsov.</i>	173
MAIN CLINICAL AND DEMOGRAPHIC COVID-19 INDICATORS DURING THE MAXIMUM SPREAD SARS-COV-2 PANDEMIC ON THE EXAMPLE OF THE INFECTIOUS HOSPITAL IN THE MOSCOW OBLAST <i>T.V. Stashko</i>	176
DETERMINATION OF IgM AND IgG ANTIBODIES TO THE SARS-COV-2 VIRUS IN THE SERUM OF CONVALESCENTS BY DIFFERENT METHODS AND KITS FROM DIFFERENT MANUFACTURERS <i>A.P. Toptygina, L.I. Novikova, M.A. Smerdova, S.S. Bochkareva, A.V. Aleshkin.</i>	178
FORMATION OF POPULATION IMMUNITY TO SARS-CoV-2 IN THE MOSCOW REGION <i>T.A. Chekanova, V.G. Akimkin, A.V. Kalenskaya, T.V. Tyrgina, E.V. Tivanova</i>	180
CHARACTERISTICS OF INCIDENCE RATE OF COVID-19, ACUTE RESPIRATORY DISEASES, INFLUENZA AND COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA IN RUSSIA ACCORDING TO CLIMATE, GEOGRAFICAL ASPECTS AND POPULATION DENSITY <i>N.Yu. Pshenichnaya, I.A. Lizinfeld, G.Yu. Zhuravlev, N.S. Morozova.</i>	184
EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF THE COURSE OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN PATIENTS OF THE CITY OF SARATOV AND SARATOV OBLAST <i>E.A. Chumachkova, S.A. Portenko, E.S. Kazakova, O.V. Kedrova, S.A. Shcherbakova, T.L. Voznyuk, I.I. Krupinskaya, R.N. Steshenko</i>	186
VARIABILITY OF SARS-COV2 AS A FACTOR OF CONTROL LOSS OVER THE DISTRIBUTION OF CORONAVIRUS INFECTION <i>A.O. Yakimova, I.V. Chebotareva, D.Yu. Kiryushina, I.L. Ershova, L.V. Lyubina, N.M. Lipunov, G.P. Bezyaeva, L.V. Panarina, V.I. Kiseleva</i>	192

METHODOLOGICAL ISSUES IN MOLECULAR DIAGNOSTICS

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF IgM AND IgG TO SARS-COV-2 <i>Yu.A. Akinshina, S.S. Mardany</i>	194
DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC KIT FOR DETECTION OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> <i>A.V. Borodulin, T.A. Bondarenko, V.V. Borunova, R.I. Ludannyy</i>	196
DEVELOPMENT OF A REAGENT ASSAY FOR DETECTION OF MUTATIONS IN <i>rpsL</i> GENE ASSOCIATED WITH STREPTOMYCIN RESISTANCE IN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> <i>V.V. Borunova, A.V. Borodulin, T.A. Bondarenko, R.I. Ludannyy</i>	198
MONITORING OF ANTI-SARS-COV-2 ANTIBODIES IN CONTACT PEOPLE BEFORE AND AFTER INCUBATION OF BLOOD IN SMARTUBES <i>R.A. Burkhanov, L.V. Cherkasova, R.O. Temirlieva, Yu.A. Astrakhantsev, A.P. Lapko, A.I. Vidrak, V.V. Sorvachev, D.E. Melamed, E.V. Kravchenko</i>	200
DNA VACCINE AGAINST MARBURG VIRUS CONTAINING BASIC PATHOGEN ANTIGENS <i>N.V. Volkova, A.A. Isaeva, O.S. Taranov, E.I. Kazachinskaya, D.N. Shcherbakov</i>	202
TESTING OF RUSSIAN DIAGNOSTIC KIT OF REAGENTS FOR DIFFERENTIATION OF HHV-6A AND HHV-6B ON THE CONTROL SAMPLES PANEL <i>A.A. Vyazovaya, E.A. Domonova, A.V. Lisok, O.Y. Silvestrova, M.A. Nikolskiy, V.E. Vedernikov, O.V. Narvskaya</i>	204
STRUCTURE IDENTITY OF RECOMBINANT INTERFERON BETA-1b MOLECULE: VERIFICATION METHOD DEVELOPMENT <i>E.O. Goloshchapova, A.S. Minero, O.B. Runova, O.B. Ustinnikova</i>	207
DEVELOPMENT OF EXPRESSION CASSETTE FOR EFFICIENT OBTAINING OF NS1 PROTEIN OF THE DENGUE VIRUS <i>I.S. Kassirov, A.S. Dolgova</i>	209
RESEARCH OF RECOMBINANT <i>M. LEPRAE</i> PROTEINS AS SERODIAGNOSTIC ANTIGENS <i>A.G. Korolyova-Ushakova, E.A. Panfertsev, E.V. Baranova, A.A. Gorbatov, S.F. Biketov</i>	211
CLINICAL TRIALS OF THE DIAGNOSTIC SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF GENETIC RISKS OF CARDIOEMBOLIC AND ATHEROTROMBOTIC SUBTYPES OF ISCHEMIC STROKE <i>V.I. Korchagin, O.P. Dribnokhodova, K.O. Mironov</i>	212
EVALUATION OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF TB DIAGNOSTIC REAGENT KITS ON DOMESTIC CONTROL PANEL OF EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SAMPLES <i>I.S. Litau, M.V. Alvarez Figueroa, A.A. Kazyulina, L.V. Domotenko</i>	216
THE MODIFICATION OF DNA ISOLATION METHOD TO INCREASE PCR SENSITIVITY IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES <i>K.A. Osyenin, K.V. Usoltsev, D.A. Mirgazov, L.I. Zaynullin</i>	221
NOVEL BIOMARKERS OF INVASIVE ASPERGILLOSIS CAUSATIVE AGENTS FROM SPECTRA-FORMING MOLECULES REVEALING BY LINEAR MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY <i>I.A. Ryabinin, N.V. Vasilyeva</i>	223
DEVELOPMENT OF SOFTWARE FOR THE QUANTITATIVE ACCOUNTING OF RESULTS OF PRIMARY SCREENING AND SEROMONITORING OF ORTHOPOXVIRAL INFECTIONS <i>P.V. Filatov, A.G. Poltavchenko, A.V. Ersh, N.D. Ushkalenko, K.S. Kungurtsev, A.K. Gunger</i>	225

MISCELLANEOUS

SOME FEATURES OF THE STRUCTURE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF UROPATHOGENS ISOLATED IN CHILDREN WITH URINARY TRACT INFECTIONS

N.A. Anikeeva, S.V. Tereshchenko, S.S. Kantutis, N.A. Sadomskaya, A.V. Nesina, N.A. Mayorova, A.Yu. Lashko, T.V. Krygina 227

THE ROLE OF PERIPLASMC CHAPERONS IN FORMATION OF REDUCED SENSITIVITY OF THE GONOCOCCUS TO BROAD-SPECTRUM ANTIBIOTICS

I.N. Bodoev, M.V. Malahova, O.V. Pobeguts, I.O. Butenko, A.I. Manolov, I. Altuhov, V.G. Zgoda, E.N. Iliina, V.M. Govorun 229

VARIABILITY OF GENES ENCODING PROTEINS OF THE INTERNALIN CLASS IN *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS

T.V. Illarionova, E.K. Psareva, E.A. Potemkin, S.A. Ermolaeva 231

RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* STRAINS CONTAINING ALLELIC VARIANTS OF GENE ENCODING *LISTERIA MONOCYTOGENES* INTERNALIN A PROTEIN

Yu.S. Kokurina, E.K. Psareva, Ya.M. Chalenko, S.A. Ermolaeva 233

INCREASING VIRULENCE OF NONPATHOGENIC INFLUENZA VIRUS H5N3 DURING ADAPTATION FOR MICE

N.F. Lomakina, T.A. Timofeeva, I.A. Rudneva, A.V. Lyashko, O.L. Voronina, E.I. Aksenova, N.N. Ryzhova, M.S. Kunda, A.A. Treshchalina, A.S. Gambaryan 235

MICROBIOLOGICAL MONITORING AND CONTROL OF ANTIBIOTIC REZISTENCE IN SOMATIC HOSPITALS

T.A. Semenenko, E.V. Zhukova, T.P. Govtyanskaya, A.A. Burova 237

VIRULENCE OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* CARRYING *HLA* AND *CNF1* GENES FOR *GALLERIA MELLONELLA* LARVAE

P.V. Slukin, L.V. Kolupaeva, N.A. Slukina, N.N. Podgornaja, N.K. Fursova 241

MONITORING OF *DIROFILARIA* AND *FRANCISELLA TULARENSIS* IN MOSQUITO BY PCR IN THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA

O.Yu. Starostina, G.V. Berezkina, T.S. Ryazanova, S.Yu. Zelikman, A.V. Sverdlova, V.V. Yakimenko, A.H. Nurpeisova 243

STUDY OF BACTEREMIA PATHOGENS SPECTRUM IN VERSATILE HOSPITAL PATIENTS

T.N. Suborova, S.A. Svistunov, A.A. Kuzin, O.P. Sidelnikova 245

GENETIC POLYMORPHISMS OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS

N.I. Khammadox, A.I. Khamidullina, K.V. Usoltsev, T.Kh. Faizov 247

COMPARATIVE STUDY OF HEMOLYMPH AND TOTAL SUSPENSION OF TICKS BY MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR THE PRESENCE OF DNA FROM RICKETTSIA

S.V. Shtrek, I.E. Samoylenko, G.V. Berezkina 249

GENOME SEQUENCE OF EUROPEAN BAT 1 LYSSAVIRUS ISOLATED FROM *EPTESICUS SEROTINUS*, WHICH WAS WAS CAUGHT NEAR VORONEZH CITY IN LATE 2019

A.S. Speranskaya, A.E. Samoilov, V.V. Kaptelova, I.V. Artyushin, E.G. Simonova, A.A. Shabeykin, A.M. Gulyukin, T.V. Stepanova, V.V. Stafford, A.V. Parshikova, V.G. Dedkov 251

EVALUATION OF THE REGULATORY SEQUENCE OF GMOS PRESENCE IN POLLEN COLLECTED BY BEES

K.A. Osyenin, A.R. Makaeva, D.A. Mirgazov, I.A. Elizarova 253

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В КЛИНИЧЕСКИХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ



АССОЦИИИ ЭКСПРЕССИИ микроРНК С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ ПРЕПАРАТОМ ОЛОКИЗУМАБ

И.В. Буре¹, Д.С. Михайленко^{1,2}, Е.Б. Кузнецова^{1,2}, Е.А. Алексеева¹,
К.В. Бондарева³, М.В. Немцова^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет),
Москва;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва;

³ООО «ОСТ Рус», Санкт-Петербург

Ключевые слова: ревматоидный артрит, микроРНК, олокизумаб, биомаркер

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-18>

ASSOCIATIONS BETWEEN miRNA EXPRESSION IN RUSSIAN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND EFFICIENCY OF OLOKIZUMAB TREATMENT

I.V. Bure¹, D.S. Mikhaylenko^{1,2}, E.B. Kuznetsova^{1,2}, E.A. Alekseeva¹,
K.V. Bondareva³, M.V. Nemtsova^{1,2}

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian
Federation (Sechenov University), Moscow, Russia;

²Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia;

³«OST Rus», St. Petersburg, Russia

Key words: rheumatoid arthritis, microRNA, olokizumab, biomarker

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-18>

Введение. Ревматоидный артрит (РА) — хроническое системное воспалительное заболевание соединительной ткани с прогрессирующим поражением суставов и аутоиммунными нарушениями. Число больных РА достигает почти 1% населения мира, что делает актуальным поиск эффективных маркеров для диагностики РА и персонализированный подбор терапии. Олокизумаб — моноклональное антитело, которое ингибирует сигнальный путь IL6/IL6R, активированный у пациентов с РА. Нами были подобраны микроРНК, потенциально ассоциированные с развитием, течением и лечением РА (miR-29, miR-16, miR-155, miR-20a, miR-451, miR-26b, miR-522, miR-192, miR-137),

и изменение их экспрессии исследовано у пациентов в процессе лечения олокизумабом.

Цель исследования. Определить микроРНК, которые можно использовать для прогнозирования эффективности и безопасности лечения препаратом олокизумаб у российских пациентов.

Материалы и методы. В работе были использованы образцы плазмы крови 103 российских пациентов с РА, получавших терапию олокизумабом. Тотальную РНК выделяли с помощью miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen). Экспрессию микроРНК до лечения, через 12 и 24 недели после начала лечения препаратом оценивали методом ОТ-ПЦР, используя наборы MiScript II RT Kit (Qiagen) и MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) по протоколам производителя. Корреляция между уровнями микроРНК и показателями эффективности и безопасности терапии олокизумабом оценивалась с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты. В ходе статистического анализа полученных данных была выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) корреляция между экспрессией ряда рассмотренных микроРНК с показателями ACR50 и DAS28, характеризующими эффективность и безопасность лечения олокизумабом. Кроме того, была показана корреляция между исходным уровнем относительной экспрессии miR-26b, miR-29 и тяжестью заболевания у российских пациентов ($p = 0,0486$ и $0,0141$ соответственно), а также miR-522 и наличием антицитруллиновых антител ($0,0447$). При многофакторном регрессионном анализе более высокий исходный уровень экспрессии микроРНК miR-29, miR-26b, miR-451 и miR-522 достоверно являлся независимым предиктором худшего клинического ответа на олокизумаб.

Выводы. Четыре микроРНК: miR-29, miR-26b, miR-451 и miR-522, для которых в ходе исследования была обнаружена достоверная корреляция с показателями эффективности лечения олокизумабом, являются потенциальными прогностическими маркерами ответа на терапию.

Исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашение 14.605.21.0003, уникальный идентификатор проекта FMEFI60518X0003).



ЧАСТОТА ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ Arg122 His ГЕНА *PRSS1* и Phe508Del ГЕНА *CFTR* ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Л.Ф. Галлямова¹, М.Н. Ситдикова¹, А.К. Имаева¹,
А.Х. Нурғалиева¹, Э.К. Хуснутдинова²

¹ФГБУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа;

²ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Уфа

Ключевые слова: острый панкреатит, хронический панкреатит, мутация

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-20>

FREQUENCY OF Arg122His GENETIC MUTATIONS OF THE *PRSS1* GENE AND Phe508Del OF THE *CFTR* GENE IN ACUTE PANCREATITIS

L.F. Gallyamova¹, M.N. Sitdikova¹, A.K. Imaeva¹,
A.K. Nurgalieva¹, E.K. Khusnutdinova²

¹Federal State Budgetary Institution of Higher Education «Bashkir State University», Ufa, Russia;

²Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences Ufa, Russia

Key words: acute pancreatitis, chronic pancreatitis, mutation

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-20>

Введение. Острый панкреатит (ОП) — остро протекающее асептическое воспаление поджелудочной железы демаркационного типа, в основе которого лежат некробиоз панкреатоцитов и ферментная аутоагрессия. Последующий некроз и дистрофия железы определяют хронический панкреатит (ХП). В патогенезе ОП и ХП большое значение придают генетической предрасположенности, например, мутациям гена катионного трипсиногена (*PRSS1*), гена трансмембранного регулятора кистозного фиброза (*CFTR*) и др. В гене *PRSS1* наиболее часто встречается мутация Arg122His, она обуславливает устойчивость трипсиногена к воздействию протеаз и чаще других встречается в семьях с отягощённой наследственностью. При ХП обнаружены мутации гена *CFTR*, которые принято связывать с развитием муковисцидоза. Однако, в отличие от муковисцидоза, при ХП обычно выявляют гетерозиготные мутации, при этом функции поджелудочной железы исходно не страдают, нарушен не столько транспорт хлора, сколько бикарбонатов в протоках железы.

Цель исследования. Провести анализ частоты встречаемости мутаций Arg122His гена *PRSS1* и Phe508Del гена *CFTR* у больных ОП и здоровых доноров из Республики Башкортостан.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 231 пациента с ОП и 265 здоровых доноров. ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование проводилось с помощью набора реактивов для аллель-специфичной ПЦР компании «Литех» согласно инструкции производителя.

Результаты. Мутация Arg122His гена *PRSS1* выявлена у 2 (0,87%) больных ОП, среди здоровых лиц данное изменение гена не обнаружено. Мутация Phe508Del гена *CFTR* идентифицирована у 6 (2,60%) пациентов, причем трое из них имели деструктивную форму заболевания (панкреонекроз). У здоровых индивидов случаи мутации гена *CFTR* обнаружены у 2 (0,75%) доноров.

Выводы. Наличие мутации Phe508Del гена *CFTR* сопряжено с более выраженными структурными и функциональными нарушениями поджелудочной железы. Результаты подобных исследований могут помочь в разработке стратегий ранней диагностики, лечения и профилактики ОП.



ДИАГНОСТИКА МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ: МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И МИКРОСКОПИЯ

Р.Б. Гудкова, К.К. Носкова, Ж.В. Борунова, А.С. Дорофеев, Н.А. Фадеева, Г.Г. Варванина

Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ, Москва

Ключевые слова: ДНК микобактерий туберкулёза, ПЦР, кислотоустойчивые микобактерии

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-22>

MYCOBACTERIAL INFECTIONS DIAGNOSTICS: MOLECULAR AND MICROSCOPY RESEARCHES

Gudkova R.B., Noskova K.K., Borunova Z.V., Dorofeev A.S.,
Fadeeva N.A., Varvanina G.G.

The Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Key words: DNA *Mycobacterium tuberculosis*, polymerase chain reaction, acid-resistant mycobacteria

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-22>

Введение. У иммунокомпрометированных больных повышен риск инфицирования микобактериями (МБ) с поражением лёгких, кишечника. Сходную локализацию патологического процесса, клиническую и морфологическую картину имеют абсолютно патогенные туберкулёзные и условно патогенные нетуберкулёзные МБ. Дифференциальная диагностика таких заболеваний затруднена и обусловлена увеличением количества молекулярно-биологических методов исследования.

Цель исследования. Повысить раннее выявление туберкулёза в биологическом материале молекулярными методами у больных, получающих химиотерапию и биологические препараты, в условиях многопрофильного стационара.

Материалы и методы. В МКНЦ им. А.С. Логинова в отделе ПЦР клинико-диагностической лаборатории определяли ДНК микобактерий в материале из отделений (бронхоальвеолярный лаваж, мокрота, эндотрахеальный аспират, плевральная и асцитическая жидкость, смывы из брюшной полости, биоптаты слизистой кишки). Выявляли ДНК микобактерий туберкулёза — *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Использованы реагенты «АмплиСенс МТС-FL», включающие микобактерии разной вирулентности (*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinipedii*). В клиническом отделе для выявления кислотоустойчивых микобактерий возбудителей туберкулёза акти-

номицетов применяли микроскопию с окрашиванием препаратов по Цилю–Нильсену.

Результаты. С 2017 в МКНЦ им. А.С. Логинова исследовано 483 пробы больных из различных отделений. У пациентов, получающих биологическую терапию или химиотерапию, иммунологическая недостаточность затрудняет дифференциальный диагноз между опухолевым процессом в лёгких, кишечнике и инфекционным поражением. В 477 случаях ДНК МТС не обнаружено. Впервые туберкулёз выявлен в 6 случаях. В 1 случае выявлен комплекс МТС в асцитической жидкости (больной из реанимационного отделения). В 3 случаях (бронхоальвеолярный лаваж) впервые установленный туберкулёз подтверждён ПЦР. В 2 случаях методом ПЦР не выявлены ДНК МТС. В этих двух неподтверждённых случаях в препаратах, окрашенных по Циль–Нильсену, выявлены *Actinomycetales*.

Выводы. Для диагностики туберкулёзной инфекции в биологическом материале необходимо использовать выявление ДНК возбудителя туберкулёза методом ПЦР.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГЕПАТИТА Е В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**В.В. Давыдов¹, С.В. Жаворонок¹, Л.А. Анисько¹, Е.Л. Гасич², С.И. Марчук¹,
П.А. Семижон², И.В. Потемкин^{3,4}, А.А. Карлсен^{3,4}, К.К. Кюрегян^{3,4}, М.И. Михайлов^{3,4}**

¹УО Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;

³ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва;

⁴ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва

Целью настоящего исследования явилось молекулярно-эпидемиологическое исследование штаммов вирусного гепатита Е (ВГЕ), выделенных из организма человека и животных в Республике Беларусь. Образцы биологического материала от 97 пациентов, 79 свиней, 28 диких кабанов, 40 оленей, 359 кроликов использовали для обнаружения РНК ВГЕ при помощи ПЦР-анализа. Выделенные нуклеотидные последовательности (n=9) подвергли процедуре секвенирования и филогенетическому анализу. Построена модель эволюционных отношений для последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса. Изученные последовательности распределились по двум основным кладам субгенотипов 3-го генотипа вируса. В пределах клады «Zabchij» кластеризуется 5 из 9 изученных последовательностей, а в кладе «Zefg» — 2 изученных изолята. Последовательности, выделенные из организма кроликов, с вероятностью 94% образуют отдельную кладу дендрограммы в пределах 3-го генотипа. Изученные нуклеотидные последовательности ВГЕ, выделенные из организма человека и животных, кластеризуются с референсными последовательностями субгенотипов 3с, 3f, 3i и 3ra. Доказана возможность завоза ВГЕ в Республику Беларусь с территории Западной Европы и Российской Федерации, а также существование аутохтонных случаев заболевания ВГЕ, имеющих зоонозную природу.

Ключевые слова: вирусный гепатит Е, филогенетический анализ, молекулярная эпидемиология

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-24>

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS E IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**V.V. Davydov¹, S.V. Zhavoronok¹, L.A. Anisko¹, E.L. Gasich², S.I. Marchuk¹,
P.A. Semizhon², I.V. Potemkin^{3,4}, A.A. Karlsen^{3,4}, K.K. Kyuregyan^{3,4}, M.I. Mikhailov^{3,4}**

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

²The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;

³I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

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

The objective of this research was a molecular epidemiological study of hepatitis E virus (HEV) strains obtained from humans and animals in Belarus. Samples of biological material from 97 patients, 79 pigs, 28 wild boars, 40 deers, 359 rabbits were testing for HEV RNA in RT-PCR. The obtained nucleotide sequences (n=9) were subjected to sequencing and phylogenetic analysis. The model of evolutionary relationships for the sequences encoding the viral capsid protein fragment was constructed. The sequences from this study split up between the two

main clades of sub genotypes of the viral genotype 3. Within the «3abchij» clade, 5 of the 9 studied sequences were clustered, and within the «3efg» clade 2 studied isolates were the subject to clustering. The sequences from rabbits formed a separate clade on dendrogram within the genotype 3 with a 94% probability. The studied HEV nucleotide sequences obtained from humans and animals were clustering with subgenotype reference sequences 3c, 3f, 3i, and 3ra. The possibility of HEV import to the Republic of Belarus from Western Europe and the Russian Federation, as well as existence of autochthonous zoonotic cases of HEV infection has been providing.

Key words: viral hepatitis E, phylogenetic analysis, molecular epidemiology

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-25>

Введение. Вирус гепатита Е (ВГЕ) представляет собой одноцепочечный квазиоболочечный РНК-вирус с позитивной полярностью, относящийся к виду *Orthohepevirus A* рода *Orthohepevirus*, семейства *Hepeviridae*. Гепатит Е (ГЕ) — это, как правило, острое самоограниченное заболевание с летальностью от 0,5 до 3% у молодых и иммунных лиц. В случае заражения ВГЕ беременных в 3-м триместре смертность может достигать 30%. По оценкам ВОЗ, ежегодно происходит 20 миллионов случаев инфицирования, что приводит к 3 миллионам симптоматических случаев ГЕ, и около 70 000 смертей, связанных с ним. Истинное глобальное бремя данного заболевания, вероятно, является ещё большим. Исследования серопревалентности здоровых людей, проведённые в различных странах, показывают, что до трети населения имеет анamnестические антитела против ВГЕ [1].

Основной путь передачи ВГЕ — фекально-оральный. Ранее считалось, что ВГЕ-инфекция является проблемой здравоохранения только в развивающихся странах. Действительно, по данным ВОЗ, страны Восточной и Южной Азии являются гиперэндемичными по ГЕ. Однако в соответствии с новой парадигмой ВГЕ является одной из наиболее распространённых причин острого вирусного гепатита, в том числе и в странах с развитой инфраструктурой.

На основе филогенетического анализа все штаммы ВГЕ относят к 8 генотипам [2]. Штаммы, относящиеся к генотипам 1 и 2, являются облигатными патогенами людей. Штаммы ВГЕ генотипов 3 и 4 являются зоонозными и имеют широкий спектр хозяев, которыми могут быть дикие и домашние свиньи, олени, кролики, мангусты. Заражение людей от животных-резервуаров является основной причиной аутохтонных спорадических случаев ГЕ в промышленно развитых странах.

Организация генома ВГЕ достаточно проста. РНК вируса размером 7,2 kb содержит только 3 открытых рамки считывания (ОРС), причем ОРС2 и ОРС3 частично перекрываются друг с другом. ОРС1 обеспечивает синтез неструктурного полипротеина, необходимого для репликации вируса. ОРС2 образует субгеномную бицистронную РНК размером 2 kb и кодирует белок капсида.

ОРС3 является наименьшей из трех и перекрывается с ОРС2 примерно на 300 нуклеотидов в альтернативной рамке считывания. Область перекрытия ОРС2 и ОРС3 является наиболее консервативной последовательностью, практически лишённой полиморфизма.

Проведённые нами исследования показывают, что все штаммы ВГЕ, выделенные из образцов, полученных от человека и животных в Республике Беларусь, относятся к 3-му генотипу вируса [3]. Систематика субгенотипов ВГЕ-3, основанная на изучении различий эволюционного расстояния (*p*-distance) последовательностей генома вируса, демонстрирует сложный паттерн с формированием разных филогенетических групп. Так, субгенотипы 3a, 3b, 3c, 3h, 3i и 3j (3abchij) и субгенотипы 3e, 3f и 3g (3efg) образуют две главных филогенетических клады. Процесс систематики вирусного разнообразия имеет ряд трудностей. Во-первых, в настоящее время нет общепринятого согласованного списка эталонных последовательностей для этих субгенотипов, хотя были предприняты попытки стандартизации для ВГЕ-3. Во-вторых, не выявлено согласованных критериев, которые определяют расстояния внутри и между субгенотипами. Например, *p*-расстояния между последовательностями ВГЕ-1 меньше 0,12, а между субгенотипами ВГЕ-3 — от 0,12 до 0,26 и от 0,13 до 0,18 для субгенотипов ВГЕ-4. Кроме того, в пределах этих генотипов диапазоны расстояний внутри и между субгенотипами перекрываются. В связи с этим некоторые полные последовательности генома получили конфликтующие назначения подтипов [4]. Таким образом, дискретные искусственно введённые категории, используемые для классификации, часто становятся произвольными, так как их генетическая индивидуальность размывается в континуум изменчивости с описанием дополнительных новых мутантных линий или рекомбинантов. Несмотря на это, важно иметь хотя бы общий набор эталонных последовательностей, чтобы можно было сравнить результаты различных исследований.

Цель исследования. Изучение генетического полиморфизма штаммов ВГЕ, выделенных из организма человека и животных в Республике Беларусь.

Материалы и методы. В течение периода с 2017 по 2020 г. были собраны образцы биологического материала от 97 пациентов, 79 свиней, 28 диких кабанов, 40 оленей, 359 кроликов. Полученные образцы использовали для обнаружения РНК ВГЕ при помощи ПЦР-анализа. Набор для выделения нуклеиновых кислот (Jena Bioscience, Германия) использовали в соответствии с протоколом производителя для выделения тотальной РНК. Для выявления РНК ВГЕ применяли адаптированный нами метод гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами, ориентированными на участок ОРС2 генома ВГЕ с 5905 нт по 6635 нт. Чувствительность теста — не менее 10 МЕ/мкл,

специфичность — 100%. Условия проведения ОТ-ПЦР соответствовали описанным ранее. Подтверждение положительных результатов проводили коммерческим набором HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar[®], Altona, Германия).

Набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Германия) использовали для экстрагирования из агарозы продуктов амплификации, содержащихся в геле. Нуклеотидную последовательность фрагмента генома ВГЕ определяли в ходе прямого секвенирования ампликонов на автоматическом секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (ABI, Foster City, США) с использованием набора BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ, их генотипирование выполняли с помощью программного обеспечения MEGA X. В анализ были включены 37 нуклеотидных последовательностей, являющихся фрагментами ORC2 ВГЕ величиной 273 нуклеотида (нуклеотидные позиции 6193–6466 относительно штамма Burma, номер в GenBank M73218). 9 последовательностей были выделены из биологического материала человека и животных в Республике Беларусь, 23 референсные последовательности для 1–7 генотипов ВГЕ и субгенотипов ВГЕ-3, предложенных Smith D.B. и соавторами [4], 3 наиболее близкие последовательности к выделенным в Беларуси, установленные в результате BLAST-анализа. Последовательность птичьего ВГЕ была включена как внешняя группа для отрицательного контроля. Филогенетический анализ был проведен методом максимального правдоподобия и модели Хасегава–Кишино–Яно.

Результаты и обсуждение. На основе филогенетического анализа последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса, построено филогенетическое дерево, которое позволило оценить степень генетического родства последовательностей ВГЕ, выделенных от человека и животных в Беларуси, с референсными последовательностями ВГЕ, установленными для генотипов и субгенотипов, и гомологичными последовательностями из базы данных GenBank. Все последовательности ВГЕ, выделенные в Беларуси, кластеризуются в пределах 3-го генотипа вируса. В большинстве случаев последовательности были генотипированы, для них были назначены субгенотипы. Изученные последовательности распределились по двум основным кладам субгенотипов 3-го генотипа вируса. В пределах клады «Zabchij» кластеризуется 5 из 9 изученных последовательностей, а в кладе «3efg» — 2 изученных изолята. Две нуклеотидные последовательности, выделенные из организма кроликов, с вероятностью 94% образуют отдельную кладу дендрограммы в пределах 3-го генотипа, образуя единую ветвь с референсной последовательностью кроличьего ВГЕ.

Последовательность генома вируса, выделенная из организма пациента в 2017 г., который за 1 месяц до начала заболевания выезжал во Францию, а также постоянно употребляет в пищу сырокопченую колбасу домашнего

производства, с вероятностью 97% образует единую филогенетическую ветвь с последовательностью, выделенной из традиционной корсиканской сыро-вяленной свиной колбасы «Фигателли» («KJ558497_S.s_Figatellu_FR_2011|g3f»). Между этими последовательностями практически отсутствует эволюционная дистанция ($p\text{-distance} = 0,004 \pm 0,0041$), что позволяет утверждать о завозном характере данного клинического случая. Для этого изолята был назначен 3f субгенотип, поскольку с вероятностью 99% эта последовательность образует единую филогенетическую ветвь с референсной последовательностью «AB369687_H.s_TH_1998|g3f» ($p\text{-d} = 0,09 \pm 0,021$).

Возможность завоза ВГЕ в Беларусь из стран Европы также подтверждает молекулярно-генетическое исследование нуклеотидной последовательности, выделенной в 2018 г. из организма пациента Fe, имеющего в анамнезе в пределах инкубационного периода эпизод выезда за пределы Республики Беларусь в страны Западной Европы. Изолят, выделенный из его организма, относится к 3с субгенотипу ВГЕ, поскольку его разделяет незначительное эволюционное расстояние ($0,05 \pm 0,015$) с референсным штаммом «FJ705359_W.b_DE_2006|g3c», выделенным из организма дикого кабана в Германии. Эта последовательность также имеет сходство на 92% с последовательностью, выделенной из ливерной колбасы в Нидерландах в 2016 г., с которой её разделяет минимальное эволюционное расстояние, составляющее $0,01 \pm 0,007$. В эту же группу последовательностей с вероятностью 97% также отнесен изолят «Patient_Jb_BY_2020|g3», выделенный из организма пациента, прибывшего из стран Западной Европы, что, вероятно, также свидетельствуют о случае завоза патогена из-за пределов Беларуси и в данном случае.

Географическое расположение Республики Беларусь в центре Европейского континента обуславливает возможность завоза ВГЕ не только с западного, но также и с восточного направления. Последовательность ВГЕ изолята, выделенного в 2019 г. из организма пациента Pf, кластеризуется с последовательностями в пределах 3g субгенотипа, однако данный результат был подтвержден только в 82% репликаций, что не является статистически достоверным. Эта последовательность имеет наименьшую эволюционную дистанцию, составляющую $0,13 \pm 0,026$, с последовательностью изолята «HQ380097_S.s_RF_2010|g3», выделенную из организма домашней свиньи в 2010 г. в Российской Федерации, что также не носит статистически достоверного характера.

В результате проведённых исследований удалось выявить аутохтонные случаи заболевания ГЕ в Беларуси. Исследование нуклеотидной последовательности, выделенной из организма пациента в 2017 г., употреблявшего свиную печень, не прошедшую термическую обработку, позволило установить высокую степень гомологии с последовательностью, выделенной из фекалий домашней

свиньи из Минской области, а также последовательностью, выделенной из организма дикого кабана из Смолевичского района Минской области. Все три последовательности кластеризуются в одной филогенетической ветви дендрограммы в 76% репликаций. Величина эволюционных дистанций между этими последовательностями составляет $0,13 \pm 0,025$ и $0,14 \pm 0,025$ соответственно. Изоляту, выделенному из организма дикого кабана, назначен 3i субгенотип ввиду высокой степени идентичности этой последовательности с референсным штаммом «FJ998008_W.b_DE_2007|g3i» этого субгенотипа ($pd = 0,1 \pm 0,021$).

Выводы. Последовательности ВГЕ, выделенные в Беларуси, демонстрируют широкий генетический полиморфизм в пределах 3-го генотипа. Изученные нуклеотидные последовательности ВГЕ, выделенные из организма человека и животных, кластеризуются с референсными последовательностями 3с, 3f, 3i и 3ra субгенотипов. Доказано существование случаев завоза возбудителя ГЕ в Республику Беларусь с территории Западной Европы и Российской Федерации, а также существование аутохтонных случаев заболевания ВГЕ, имеющих зоонозную природу.

Литература

1. Purcell R., Emerson S. Prevention. In: Thomas H., Lemon S., Zuckerman A. (eds.). *Viral hepatitis*. 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing. 2005. P. 635–645.
2. Purdy M., Harrison T., Jameel S., Meng X., Okamoto H., Van der Poel W. et al. ICTV virus taxonomy profile: hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 2017. Vol. 98. P. 2645–2646.
3. Davydov V. et al. Epidemiological and Epizootic Intensity of HEV-Infection in Belarus. *E.C. Microbiology*. 16.5. 2020. P. 1–11.
4. Smith D., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E., Ulrich R., Johne R., et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 2016. Vol. 97. P. 537–542.



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.Г. Денисова¹, А.Н. Данилов², И.А. Мамонова¹, Т.Л. Абрамян¹

¹ГУЗ «Саратовский областной клинический центр профилактики и борьбы со СПИД»,
Саратов;

²ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов

Ключевые слова: ранняя диагностика ВИЧ у детей, молекулярные методы исследования

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-30>

MOLECULAR METHODS IN EARLY DIAGNOSTICS OF HIV INFECTION IN SARATOV OBLAST CHILDREN

E.G. Denisova¹, A.N. Danilov², I.A. Mamonova¹, T.L. Abramyan¹

¹Saratov Regional Centre for Disease Prevention and Control of AIDS, Saratov, Russia;

²Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

Key words: molecular research, HIV infection in children

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-30>

Введение. В Саратовской области ежегодно регистрируются случаи ВИЧ-инфекции у детей, рождённых от ВИЧ-инфицированных матерей (1,6–0,5%). С 2015 г. в соответствии с клиническими рекомендациями «Диагностика ВИЧ-инфекции и применение антиретровирусных препаратов у детей» разработана тактика ведения ребенка ВИЧ-инфицированной матери при обследовании методами, направленными на выявление нуклеиновых кислот ВИЧ.

Цель исследования. Изучение лабораторных критериев подтверждения ВИЧ-инфекции у детей с высоким риском перинатального инфицирования с целью раннего выявления и своевременного назначения лечения.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный анализ случаев перинатального инфицирования ВИЧ детей, рождённых от ВИЧ-инфицированных матерей за период 2015–2019 гг. и текущий 2020 г. Материалом для анализа послужили амбулаторные карты 15 ВИЧ-инфицированных детей и их матерей. Обследование новорождённых детей молекулярными методами проводилось на этапе родильного дома и в возрасте до 2 мес.

Результаты. Из 15 новорождённых с положительными результатами молекулярно-генетических исследований для диагностики ВИЧ-инфекции у 57% диагноз установлен в течение первых 2 недель жизни, у 42% — к концу 2-го месяца

жизни. У 13 детей по оценке клинико-лабораторных маркеров прогрессирования ВИЧ-инфекции установлен диагноз «ВИЧ-инфекция, стадия 2Б первичных проявлений без вторичных заболеваний», у 2 детей — «ВИЧ-инфекция, стадия 2А». Диагноз ВИЧ-инфекции подтверждён получением положительных результатов выявления ДНК ВИЧ в двух отдельно взятых образцах крови у ребёнка старше 1 месяца. Матери 12 детей (80%) не состояли на диспансерном учёте в женской консультации, 2 матери (13,3%) находились в периоде серонегативного окна и не получали химиопрофилактику на этапе беременности и родов, обследованы после родов, 1 (6,6%) письменный информированный отказ. Детям назначена терапия жидкими формами антиретровирусных препаратов.

Выводы. Перинатальная передача ВИЧ-инфекции у новорождённых детей зависит от комплекса проведённых профилактических мероприятий на этапе беременности, родов, в послеродовом периоде. Использование молекулярно-генетических исследований способствует более ранней диагностике ВИЧ-инфекции у детей с перинатальным контактом, установлению диагноза ВИЧ-инфекции и своевременному назначению лечения с целью снижения заболеваемости и смертности от СПИДа.



РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕДРЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА НА УРОВНЕ ПЕРВИЧНОЙ МЕДИКО-САНИТАРНОЙ ПОМОЩИ

М.У. Дусмагамбетов¹, Д.К. Жунусов², А.М. Дусмагамбетова²

¹НАО «Медицинский университет Астана» МЗ РК, Нур-Султан, Казахстан;

²ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №5» акимата г. Нур-Султан, Нур-Султан, Казахстан

Ключевые слова: микобактерии туберкулёза, молекулярно-генетический метод

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-32>

RESULTS OF IMPLEMENTATION OF THE MOLECULAR METHOD IN THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS AT THE LEVEL OF PRIMARY HEALTHCARE

M.U. Dusmagambetov¹, D.K. Zhunusov², A.M. Dusmagambetova²

¹Astana Medical University, Nur-Sultan, Kazakhstan;

²GKP on REM «City polyclinic No. 5» of the Akimat of Nur-Sultan, Nur-Sultan, Kazakhstan

Key words: *mycobacterium tuberculosis, molecular genetic method*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-32>

Введение. В целом за годы независимости в Казахстане заболеваемость туберкулёзом снизилась на 9% с 64,4 на 100 тыс. населения в 1991 г. до 58,5 в 2015 г., а смертности — на 66% с 10,6 до 4,1 на 100 тыс. соответственно, сообщает пресс-служба МЗСР РК.

В настоящее время в стране реализуется комплексный план по борьбе с туберкулёзом на 2014-2020 гг. На современном этапе внедряется система GeneXpert, которая представляет собой полуколичественную гнездовую ПЦР, реакция проводится в картридже для определения ДНК микобактерий туберкулёза в образцах мокроты. Процесс диагностики занимает всего 2 часа, специфичность метода достигает 100%, для пациентов с положительным мазком мокроты высокая чувствительность — до 98%.

Лаборатория ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №5» обслуживает 10 организаций ПМСП, три стационара и Центр по профилактике и борьбе со СПИД г. Нур-Султан, для которых выполняются бактериоскопия мазков мокроты и при наличии показаний — МГМ.

Материалы и методы. Молекулярно-генетическое исследование для выявления туберкулёза в нашей лаборатории проводится на системе GeneXpert. Также при помощи GeneXpert диагностики выявляются мутации устойчивости к рифампицину в образцах, полученных от пациентов, у которых возможен риск развития устойчивости к данному лечебному препарату.

Результаты. В 2017 году проведено 27 исследований на аппарате GeneXpert, получено 3 положительных результата, все выделенные МКБ были чувствительны к рифампицину. Процент выявляемости туберкулёза МГМ составил 11,1%, при этом 44,3% выделенных МТБ были устойчивы к рифампицину.

В 2018 г. всего проведено 998 исследований молекулярно-генетическим методом, из которых было получено 70 положительных результатов, 38 из них устойчивы к рифампицину, в 1 случае чувствительность к рифампицину не определена. Выявляемость туберкулёза МГМ составила 7,01%, количество устойчивых к рифампицину МТБ — 44,3%.

За 2019 г. проведено 1696 ПЦР-исследований для обнаружения микобактерий туберкулёза, выявляемость составила 8,3% (141 положительный результат), из них 35,5% показали устойчивость к рифампицину.

Выводы. Этот метод применяют в лабораториях 2–3 уровней для быстрого определения и выявления МБТ, для своевременной изоляции и лечения больного. Такой современный метод диагностики туберкулёза позволяет улучшить качество, своевременность выявления заболевания и лечения.



ВЫБОР АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ОСТРОМ ТЕЧЕНИИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Н.М. Колясникова^{1,2}, Г.В. Маленко^{1*}, М.С. Щербинина³, А.А. Ишмухаметов¹,
В.В. Погодина¹

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва;

²ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

³ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва

Ряд антибактериальных препаратов, применяемых при терапии сочетанной вирусной и бактериальной инфекций, способны вызывать иммунодепрессию, утяжеление течения острой и активацию персистентной инфекции. Ранее установлено, что среди антибактериальных препаратов сильными активаторами персистентной инфекции являются стрептомицин (группа аминогликозидов), цефамезин (группа цефалоспоринов), ристомицин (полипептидный антибиотик), к группе препаратов, не вызывающих депрессию гуморального иммунитета, относятся: гентамицин (аминогликозид), канамицин (аминогликозид), левомицетин (синтетический антибактериальный препарат), флоримицин (аминогликозид). В данной работе в эксперименте на сирийских хомяках показан эффект применения антибиотика нового поколения — цефтриаксона (бета-лактамный антибиотик) на течение острого клещевого энцефалита.

Ключевые слова: антибиотики, клещевой энцефалит, сочетанные инфекции

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-34>

CHOOSING OF ANTIBIOTICS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS IN THE ACUTE COURSE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS

N.M. Kolyasnikova^{1,2}, G.V. Malenko^{1*}, M.S. Shcherbinina³, A.A. Ishmuhametov¹,
V.V. Pogodina¹

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

²Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

³Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

A number of antibacterial drugs used for the treatment of combined viral and bacterial infections can cause immunosuppression, weighting of the acute course and activation of the persistent infection. Previously, it was found that among the antibacterial drugs, strong activators of persistent infection are streptomycin (group of aminoglycosides), cefamezin (group of cephalosporins), ristomycin (polypeptide antibiotic), the group of drugs that do not cause depression of humoral immunity includes gentamicin (aminoglycoside),

**В настоящее время автор не работает.
The author is currently not working.*

kanamycin (aminoglycoside), levomycetin (synthetic antibacterial drug), florimycin (aminoglycoside). In this paper an experiment on Syrian hamsters shows the effect of using a new generation antibiotic-Ceftriaxone (beta-lactam antibiotic) on the course of acute tick-borne encephalitis.

Key words antibiotics, tick-borne encephalitis, co-infections

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-34>

Введение. Известно, что ряд антибиотиков обладает иммунодепрессивными свойствами [1, 2]. Иммунодепрессию, помимо алергизации организма, стресса, вторичных нарушений иммунорегуляции, нередко вызывают сопутствующие инфекции, а также лечебные препараты, особенно антибиотики, применяемые для терапии вторичных инфекций. В работе изучен эффект широко применяемого в настоящее время антибиотика нового поколения — цефтриаксона при остром течении клещевого энцефалита (КЭ), исходя из возможного сочетания вирусной и бактериальной инфекции и использования антибактериальных препаратов в лечебных целях. Цефтриаксон относится к цефалоспорином 3-го поколения и широко применяется для лечения инфекционных клещевых боррелиозов (ИКБ). Оказывает ли цефтриаксон иммуносупрессивное действие на острое течение КЭ в случае сочетания инфекций (например, КЭ и ИКБ), ни в одной инструкции по применению антибиотиков не указано.

Клещевые инфекции вирусной и бактериальной природы требуют принципиально разного лечения. Для лечения КЭ применяют противоклещевой специфический иммуноглобулин, препараты интерферона, рибонуклеазу, патогенетическую терапию, в то время как для лечения ИКБ применяют антибиотики. Известно, что на исход клещевой смешанной инфекции влияет приём антибиотиков, которые подавляют иммунный статус больного, что усугубляет течение КЭ. В литературе описаны случаи микст-инфекции КЭ и ИКБ, когда после улучшения состояния на фоне приёма доксициклина внезапно развилась тяжёлая очаговая форма КЭ с летальным исходом [3].

Настоящему исследованию предшествовал цикл работ, проведённых в нашей лаборатории под руководством В.В. Погодиной по изучению действия различных групп антибактериальных препаратов на хроническое течение КЭ (персистенцию вируса КЭ) на сирийских хомяках и обезьянах. Исследовался широкий спектр антибиотиков различных групп, и даны рекомендации по применению в случае возникновения сопутствующей патологии бактериальной природы (туберкулёз, пневмонии и др.). В ходе этих работ все антибиотики были поделены на 3 группы: сильные активаторы (стрептомицин, тетрациклин), слабые активаторы (цефамезин, флоримицин, канамицин) и вещества без

эффекта (ристомицин, пенициллин, ампициллин, леваридан, левомецетин, гентамицин).

Цель исследования. Поиск современных альтернативных антибиотиков, не оказывающих отягочающего действия на острое течение клещевого энцефалита при сопутствующих инфекциях бактериальной природы.

Материалы и методы. Опыты по изучению действия антибиотика цефтриаксона на инфекцию, вызванную вирусом КЭ, проводили на сирийских хомяках (массой 50–55 г), которых заражали подкожно штаммом Абдрезаков в дозе 10^2 ЛД₅₀/0,25 мл (штамм сибирского подтипа вируса КЭ, выделенный от умершего больного в 2012 г. в Челябинской области, характеризуется тенденцией вызывать острый КЭ). Одновременно с заражением сирийских хомяков вирусом КЭ начинали курс инъекций антибиотика цефтриаксона. Цефтриаксон вводили внутримышечно в течение 10 дней (согласно курсу лечения бактериальных инфекций). Расчёт доз антибиотиков для хомяков осуществляли в соответствии с терапевтическими дозами для человека при помощи таблицы [4]. По окончании курса антибиотиков для дальнейшего исследования животных обескровливали, брали мозг и селезенку в три срока (на 10-й, 20-й и 38-й дни после заражения вирусом КЭ). Уровень гуморального иммунитета в сыворотке крови (антитела IgG) определяли методом ИФА (ВКЭ-АТ (мышь)-ИФА-Бест производства «Вектор-Бест»), выявление РНК вируса КЭ в мозге и селезенке проводили методом ПЦР (АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris-FL*, ЦНИИЭ). Сирийские хомяки были выделены в 3 группы по 8 животных: 1) заражённые вирусом КЭ, не получавшие антибиотик цефтриаксон; 2) заражённые вирусом КЭ, получавшие антибиотик цефтриаксон; 3) не заражённые вирусом КЭ, получавшие только антибиотик (контрольная группа). Контрольных животных обследовали всеми перечисленными методами. У хомяков каждой группы исследовали биоматериал (сыворотка крови, мозг, селезенка).

Результаты. Эффект цефтриаксона изучали в опытах на сирийских хомяках, заражённых штаммом Абдрезаков. Титр антител (АТ) IgG в сыворотке крови сирийских хомяков, не получавших цефтриаксон, на 10-й день после заражения был в пределах 1:100–1:400, на 20-й день — 1:100–1:800, на 38-й день — 1:100–1:200; у животных, которым был введён антибиотик, титр АТ IgG в сыворотке крови был в пределах 1:200–1:400, на 20-й день — 0–1:400, на 38-й день — 0–1:400. Достоверной разницы в титре АТ после 10-го, 20-го и 38-го дней заражения в двух группах животных, получавших и не получавших антибиотик, выявить не удалось. АТ стабильно определялись в группе хомяков, не получавших цефтриаксон, в то время как у животных, которые антибиотик получали в 4 случаях, АТ выявлено не было (20-й день — 1 случай,

38-й день — 3 случая), т.е. наблюдалась некая иммуносупрессия. РНК вируса КЭ в мозге после 10-го, 20-го и 38-го дней заражения в группе хомяков, которые антибиотик не получали, стабильно определялась в достаточно высоких концентрациях, с небольшим превалированием концентрации на 10-е сутки у отдельных хомяков. В группе хомяков, которые антибиотик получали, РНК вируса КЭ также стабильно определялась в мозге в достаточно высоких концентрациях после 10-го, 20-го и 38-го дней заражения, с небольшим превалированием концентрации на 10-е сутки у отдельных хомяков. За исключением одного случая — РНК вируса КЭ не определялась в мозге хомяка на 20-е сутки. Достоверных различий в концентрации РНК в мозге хомяков, получавших и не получавших антибиотик, не выявлено. РНК вируса КЭ в селезёнке после 10-го, 20-го и 38-го дней заражения в группе хомяков, которые антибиотик не получали, определялась в очень низких концентрациях либо вообще не определялась. В группе хомяков, которые антибиотик получали, РНК вируса КЭ более стабильно определялась в селезёнке после 10-го, 20-го и 38-го дней заражения в большинстве случаев в средних и низких концентрациях. РНК вируса КЭ в селезёнке в группе хомяков, получавших антибиотик, была в некоторых случаях значительно выше по сравнению с группой животных, которые антибиотик не получали.

Таким образом, изучение действия цефтриаксона по ряду критериев оценки (провокация клинически манифестной инфекции, стимуляция репродукции вируса, иммунодепрессия) на острое течение КЭ в опыте на сирийских хомяках, заражённых подкожно штаммом Абдрезаков, позволило отнести данный антибиотик к группе слабых активаторов (таблица).

Характеристика штамма Абдрезаков (особенности вирулентности в опыте на сирийских хомяках). Из 45 хомяков, подкожно заражённых только штаммом Абдрезаков, 9 пали без видимых клинических симптомов заболевания в сроки 5, 6, 7, 10, 11, 17 и 18-й дни заболевания. В опыте на сирийских хомяках штамм Абдрезаков вызывал 20% гибели животных при средней продолжительности жизни (СПЖ) 33,2. Штамм Абдрезаков в опыте на сирийских хомяках вёл себя подобно штаммам сибирского подтипа ВКЭ, явился вирулентным для сирийских хомяков, вызвал замедленное развитие патологического процесса. Из 65 хомяков, подкожно заражённых штаммом Абдрезаков и получавших цефтриаксон, 39 пали без видимых клинических симптомов заболевания в сроки 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 19, 20 и 22-й дни заболевания. 3 хомяка из этой группы заболели с развитием параличей. Антибиотик цефтриаксон явился токсичным для сирийских хомяков. Гибель животных в контрольной группе (хомяки, не заражённые вирусом КЭ и получавшие только антибиотик) наблюдалась в первые 12 дней после введения антибиотика и составила 70%. В группе хо-

Действие цефтриаксона на острое течение клещевого энцефалита (тест на сирийских хомяках)

Критерии оценки и группировка антибиотиков	Сильный активатор	Слабый активатор	Вещества без эффекта
Провокация клинически манифестной инфекции	+	–	–
Усиление морфологических изменений в ЦНС*	+	–	–
Стимуляция репродукции вируса КЭ	++	+, ±	–
Стимуляция накопления вирусных антигенов*	+	±	–
Иммунодепрессия	++	–, ±	–
Изменение свойств персистирующего вируса (повышение вирулентности, изменение антигенных свойств, бляшечного фенотипа)*	++	+	–, ±
Группировка антибиотиков	Стрептомицин, тетрациклин	Цефамезин, флоримидин, канамицин, цефтриаксон	Ристомидин, пенициллин, ампициллин, леваридан, левомецетин, гентамицин

*Для цефтриаксона данные параметры не оценивали.

мяков, заражённых вирусом КЭ, которые антибиотик получали, летальность достигала 70% при СПЖ 16,4.

Закключение. Полученные ранее данные относительно испытанных в нашей лаборатории антибиотиков [1, 2, 5, 6], а также новые данные о применении цефтриаксона при остром течении клещевого энцефалита в настоящей работе имеют большое практическое значение. Известно, что в условиях существования сочетанных очагов клещевых инфекций человек может заболеть сразу несколькими из них, например, КЭ и ИКБ, и это требует разного специфического лечения. Кроме того, КЭ, особенно хроническое его течение, у больных часто сочетается с сопутствующими хроническими инфекциями, например, с туберкулёзом, требующим также специфического лечения. По результатам наших экспериментов, цефтриаксон оказывал незначительное иммуносупрессивное действие (в 4 случаях) и по своему действию вошел в группу слабых активаторов. Влияние цефтриаксона на течение острого, а также хронического КЭ при лечении сопутствующих инфекций бактериальной природы требует дальнейших исследований.

Что касается характеристики штамма, штамм Абдрезаков характеризуется стабильностью выявления РНК вируса в мозге и селезёнке сирийских хомяков на всех трёх сроках исследования материала, с небольшим превалированием концентрации в мозге животных на 10-е сутки. Концентрация РНК в селезёнке низкая либо вообще не определяется, не зависит от срока взятия материала. Оценка гуморального иммунитета в опыте на сирийских хомяках показала стабильное выявление антител на всех трёх сроках взятия материала. Штамм Абдрезаков вирулентен для сирийских хомяков и вызывает замедленное развитие патологического процесса, подобно другим штаммам сибирского подтипа вируса КЭ.

Литература

1. Маленко Г.В., Погодина В.В., Кармышева В.Я. Стрептомицин — активатор персистирующего вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1984. № 2. С. 217–223.
2. Маленко Г.В., Погодина В.В., Фролова М.П., Иванникова Т.А. Стратегия выбора антибиотиков для терапии бактериальных инфекций, ассоциирующихся с хроническим клещевым энцефалитом. *Вопросы вирусологии*. 1996. № 3. С. 138–141.
3. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Вашукова М.А., Волкова Л.И. Боррелии как вероятные антагонисты вируса клещевого энцефалита: паразитологический и клинический аспекты проблемы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2001. № 3. С. 3–11.
4. Paget G., Parners G. *Pharmacometrics*. 1967. Vol. 1. P. 135–167.
5. Маленко Г.В., Погодина В.В. Поиск антибиотиков, не оказывающих активирующего действия при персистенции вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1989. № 2. С. 197–200.
6. Погодина В.В., Маленко Г.В., Кармышева В.Я., Фролова М.П. Эффект гентамицина при персистенции вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1999. № 1. С. 35–39.



ОБНАРУЖЕНИЕ НОРОВИРУСА 1 ГЕНОТИПА КАК ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ВСПЫШКИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ В ДЕТСКОМ УЧРЕЖДЕНИИ г. ТОМСКА

М.В. Кондратьев, Л.М. Кондратьева

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Томской области», Томск

Ключевые слова: *норовирус GI, ОКИ, ПЦР*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-40>

DETECTION OF NOROVIRUS GENOTYPE 1 AS AN ETIOLOGICAL FACTOR IN INVESTIGATION OF ACUTE INTESTINAL INFECTION OUTBREAK IN A CHILDREN'S INSTITUTION IN TOMSK

M.B. Kondratev, L.M. Kondrateva

Federal Budgetary Institution of Healthcare «Tomsk Oblast Center for Hygiene and Epidemiology»,
Tomsk, Russia

Key words: *norovirus GI, OCI, PCR*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-40>

Введение. Одной из наиболее часто встречающихся причин вспышек острых кишечных инфекций являются норовирусы. У них выделяют 6 генотипов GI-GVI. У человека вызывают заболевания вирусы групп GI, GII и GIV. В этиологической расшифровке таких вспышек хорошо помогают молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Цель исследования. Определение этиологического агента вспышки ОКИ в детском учреждении г. Томска в рамках эпидемиологического расследования.

Материалы и методы. Проводились исследования методом ПЦР в лаборатории вирусологических исследований. Образцы были доставлены 27–29.11.2019 г.

Материалом для исследований были смывы с поверхностей объектов окружающей среды и образцы фекалий больных и контактных лиц (персонал детского учреждения).

Выделение ДНК/РНК из проб проводилось с применением набора реагентов «РИБО-преп». Для исследования смывов использовался набор «Ампли-Сенс® ОКИ-скрин-FL», предназначенный для выявления ДНК микроорганизмов рода шигеллы (*Shigella spp.*) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), сальмонеллы (*Salmonella spp.*) и термофильных кампилобактерий (*Campylobacter spp.*), аденовирусов группы F (*Adenovirus F*), РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus A*), норовирусов 2-го генотипа (*Norovirus 2* генотип) и астровирусов (*Astrovirus*).

Для исследования образцов фекалий использовались наборы «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL»; «АмплиСенс® Norovirus/GI/GII-FL» для выявления РНК норовирусов 1-го и 2-го генотипов (Norovirus GI и GII) и «АмплиСенс® Enterovirus-FL» для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*).

Результаты. При исследовании 30 смывов набором «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» были получены отрицательные результаты.

При исследовании образцов фекалий 62 человек (25 больных и 37 контактных лиц) набором «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» в 1 образце обнаружена ДНК *Campylobacter* spp. (1,6%) и в 1 образце — ДНК *Salmonella* spp. (1,6%), РНК *Norovirus* GII не обнаружена. При исследовании образцов фекалий от 9 больных на РНК энтеровирусов получены отрицательные результаты.

Принято решение провести исследование образцов набором «АмплиСенс® Norovirus/GI/GII-FL» 59 человек (25 больных и 34 контактных лица) для выявления РНК норовирусов 1-й и 2-й геногруппы (*Norovirus* GI и GII), чтобы исключить более редко встречающийся *Norovirus* GI. В результате был обнаружен именно этот генотип норовируса (GI) в 41 образце, 69,4% (во всех 25 образцах, взятых у больных, и в 16 образцах, взятых от контактных лиц). Таким образом, был установлен возбудитель, вызвавший вспышку ОКИ в детском учреждении.

Для определения генотипа норовируса методом секвенирования 43 образца фекалий больных и контактных лиц были направлены в референс-центр по мониторингу за возбудителями ОКИ (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). В 39 образцах была обнаружена РНК *Norovirus* GI. Методом секвенирования в 10 образцах был определён генотип норовируса GI.6, что подтвердило идентичность присланных образцов.

Выводы. 1. Метод ПЦР показывает свою высокую эффективность для установления этиологии вспышек ОКИ.

2. Норовирус 1-го генотипа, несмотря на редкость обнаружения, может быть этиологическим фактором возникновения вспышек ОКИ, и всегда при их расследовании надо учитывать эту вероятность.

3. Лаборатория, проводящая исследования в рамках эпидемиологического расследования вспышек ОКИ, должна быть готова к таким случаям и иметь в своём распоряжении наборы для выявления РНК норовируса 1-го генотипа.

4. При обследовании большого количества лиц могут в единичных случаях выявляться другие возбудители ОКИ, не являющиеся этиологическим фактором возникновения вспышки ОКИ.



ОБНАРУЖЕНИЕ АЛЬФАКОРОНАВИРУСОВ, БЕТАКОРОНАВИРУСОВ И АСТРОВИРУСОВ В ФЕКАЛИЯХ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.В. Корнеенко¹, А. Е. Самойлов^{1,4}, И.В. Артюшин², М.В. Сафонова³, В.Г. Дедков⁴, К.Ф. Хафизов⁵, А.А. Девяткин⁶, В.В. Каптелова¹, Е.В. Пимкина¹, А.С. Сперанская^{1,2}

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Москва;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва;

³ФКУЗ «Противочумный центр» Федеральной службы в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека;

⁴Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург;

⁵ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва;

⁶ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

В ходе данного исследования мы провели анализ виroma фекалий летучих мышей, собранных в Звенигородском районе Московской области в 2015 г. Для работы нами была использована методика выявления различных семейств и родов вирусов в фекалиях от рукокрылых с помощью амплификации фрагментов геномов вирусов, с последующим проведением высокопроизводительного секвенирования этих фрагментов. Анализ прочтений без сборки de novo позволил выявить последовательности вирусов Astroviridae, Coronaviridae и Herpesviridae. Сборка с помощью SPAdes 3.14 позволила получить последовательности вирусных фрагментов, относящихся к семействам вирусов Astroviridae и Coronaviridae длиной 460–530 п.о. Таксономическая принадлежность коронавирусов была определена до уровня рода. Наши результаты показывают, что одна летучая мышь может являться носителем нескольких видов коронавирусов, в том числе принадлежащих к разным родам. Таким образом, летучие мыши Московской области являются носителями патогенов, обладающих зооностическим потенциалом.

Ключевые слова: рукокрылые, вирусы, высокопроизводительное секвенирование, vespertilionidae

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-42>

DETECTION OF ALFACORONAVIRUSES, BETACORONAVIRUSES AND ASTROVIRUSES IN BAT FECAL SAMPLES FROM MOSCOW REGION

Е.В. Korneenko¹, А.Е. Samoilov^{1,4}, I.V. Artyushin², M.V. Safonova³, V.G. Dedkov⁴, K.F. Khafizov⁵, А.А. Deviatkin⁶, V.V. Kaptelova¹, E.V. Pimkina¹, А.С. Speranskaya^{1,2}

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Anti-Plague Center of the Federal Service for the Protection of Consumer Rights and Human Well-Being, Russia;

⁴Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Peterburg, Russia;

⁵Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russia;

⁶First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

In our study we analyzed viral RNA in bat fecal samples from Moscow region (Zvenigorod district) collected in 2015. To detect various virus families and genera in bat fecal samples we used PCR amplification of viral genome fragments, followed by high-throughput sequencing. Blastn search of unassembled reads revealed the presence of viruses from families Astroviridae, Coronaviridae and Herpesviridae. Assembly using SPAdes 3.14 yields contigs of length 460–530 b.p. which correspond to genome fragments of Coronaviridae and Astroviridae. The taxonomy of coronaviruses has been determined to the genus level. We also showed that one bat can be a reservoir of several virus genres. Thus, the bats in the Moscow region were confirmed as reservoir hosts for potentially zoonotic viruses.

Key words: Bats, viruses, high throughput sequencing, vespertilionidae

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-43>

Введение. Рукокрылые являются природным резервуаром вирусов, при этом, благодаря особенностям обмена веществ и адаптивным свойствам иммунной системы, они часто являются бессимптомными носителями [1]. Многие виды летучих мышей способны мигрировать на дальние расстояния. Часто они обитают вблизи от человеческих поселений, что увеличивает риск межвидовой передачи вирусных инфекций [2]. Известны сотни вирусов, переносимых летучими мышами и представляющих опасность для человека, таких как коронавирусы (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2), лиссавирусы (вирус бешенства), филовирусы (вирус Эболы) и многие другие [2, 3]. Изучение виroma летучих мышей расширяет знания о потенциально опасных вирусах.

С появлением технологий высокопроизводительного секвенирования стало возможным проведение метагеномного анализа и получение информации о вирусных сообществах. На данный момент в научной литературе представлено большое количество данных о мониторинге вирусов, встречающихся в летучих мышах, обитающих на территории Западной Европы (Италия, Франция, Люксембург, Словения и др.) [4], в Восточной и Западной Азии, Китае [2], а также на других континентах (на островах Индийского океана, в Африке, Австралии) [5]. Информация о вирусах, встречающихся в летучих мышах, обитающих на территории Российской Федерации, остаётся малоизученной в этом вопросе и ограничивается немногочисленными исследованиями, которые представлены в основном работами А.Д. Ботвинкина, И.В. Кузьмина с соавт. и посвящены изучению лиссавирусов в летучих мышах.

Цель исследования. Провести анализ виroma в фекалиях летучих мышей, пойманных в Звенигородском районе Московской области в 2015 г.

Материалы и методы. Сбор материала. В 2015 г. были собраны образцы фекалий от 29 рукокрылых следующих родов: *Myotis dasycneme* ($n = 5$), *Myotis daubentonii* ($n = 5$), *Myotis brandtii* ($n = 3$), *Nyctalus noctula* ($n = 4$), *Pipistrellus nathusii* ($n = 6$), *Plecotus auritus* ($n = 2$), *Vespertilio murinus* ($n = 1$), обитающих

на территории Звенигородского района Московской области (Шараповское лесничество). В 3 образцах вид рукокрылых определить не удалось. Фекалии помещали в транспортную среду с муколитиком (ТСМ) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и в таком виде хранили при -70°C до начала экспериментов.

Выделение РНК и амплификация с использованием родовых праймеров. Экстракцию РНК производили из 100 мкл фекальной суспензии набором RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Германия) с элюцией в 50 мкл с помощью станции для автоматической экстракции QiaCube (Qiagen, Германия).

Обратную транскрипцию проводили набором Реверта-Л (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) по инструкции производителя.

Полимеразные цепные реакции проводили в объеме 25 мкл с использованием праймеров, специфичных для семейства и рода вирусов *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesvirus*, *Lyssavirus*, *Bunyaviridae* (*Nairovirus*), *Filoviridae*, *Arenavirus*, *Rotavirus*, *Paramyxovirus*, последовательности которых были предоставлены В.Г. Дедковым и соавт. Протокол постановки включал: 2,5 мкл 1,76 мМ дНТФ, 1 мкл прямого праймера в концентрации 10 пмоль/мкл, 1 мкл обратного праймера в концентрации 10 пмоль/мкл, 10 мкл ПЦР-смеси 2 Blue (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия), 2 мкл кДНК, до 25 мкл объем доводили стерильной деионизированной водой.

Амплификацию проводили на амплификаторе с нагреваемой крышкой Maxygene (Axygene, США). Режим амплификации 94°C — 3 мин, $n = 1$; 94°C — 20 с, $55\text{--}47^{\circ}\text{C}$ (-2°C) — 20 с, 72°C — 30 с, по 2 цикла $\Sigma n = 10$; 94°C — 20 с, 45°C — 20 с, 72°C — 30 с, $n = 2$; 94°C — 20 с, 45°C — 20 с, 72°C — 30 с, $n = 42$; 72°C — 10 мин, $n = 1$; 4°C — хранение.

Амплификацию проводили индивидуально для каждой пары праймеров. Наличие целевых фрагментов в продуктах амплификации определяли с помощью гель-электрофореза, концентрацию фрагментов оценивали визуально, продукты амплификации смешивали в равном количестве (для каждого исследуемого животного). Смеси фрагментов очищали от реакционной смеси с помощью AMPure beads (Beckman Coulter), измеряли концентрацию нуклеиновых кислот с помощью Qubit 3.0 с применением набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) и затем использовали для подготовки библиотек.

Подготовка библиотек и анализ данных. Для подготовки библиотек использовали метод лигирования Y-образных адаптеров (Illumina). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina). Данные анализировались с помощью двух подходов: (1) описан в статье Ayginin et al., 2018; (2) фильтрация

с помощью Trimmomatic, сборка *de novo* с помощью SPAdes 3.14 и идентификация вирусных последовательностей с помощью blastn против базы данных nt.

Результаты. Мы провели анализ фекалий наиболее распространённых видов летучих мышей, обитающих на территории Московской области (*Myotis dasycneme*, *Myotis daubentonii*, *Myotis brandtii*, *Nyctalus noctula*, *Pipistrellus nathusii*, *Plecotus auritus*, *Vespertilio murinus*) на наличие вирусов семейств *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae* (*Herpesvirus*), *Rhabdoviridae* (*Lyssavirus*), *Bunyaviridae* (*Nairovirus*), *Filoviridae*, *Arenaviridae* (*Arenavirus*), *Reoviridae* (*Rotavirus*), *Paramyxoviridae* (*Paramyxovirus*). Анализ прочтений без сборки *de novo* методом, описанным в статье Auginin et al., 2018, показал, что в приготовленных библиотеках ампликонов у 17 из 29 животных обнаруживаются последовательности вирусов семейств *Astroviridae* и/или *Coronaviridae*. Ещё у двух особей были обнаружены прочтения, относящиеся к вирусам семейств *Herpesviridae*, *Rhabdoviridae* (в табличном виде эти данные не представлены).

С помощью SPAdes 3.14 были получены контиги длиной 460–530 п.о. (ожидаемой длины) вирусов у 10 животных. Результаты анализа blastn данных последовательностей представлены в таблице, при этом у 8 особей выявили корона-

Вид рукокрылых	ID образца	Длина контига (п.н.)	Ближайшая последовательность из базы nt		
			ID	% идентичности	Род
<i>Myotis brandtii</i>	Bat 27	463	MG923572.2	96,10	<i>Alphacoronavirus</i>
<i>Myotis dasycneme</i>	Bat 12	437	HM368174.1	77,33	<i>Astroviridae</i> , не классифицирован, предп. новый род
<i>Myotis daubentonii</i>	Bat 30	563	KY502400.1	91,11	<i>Alphacoronavirus</i>
		463	EU375869.1	99,75	<i>Alphacoronavirus</i>
<i>Myotis daubentonii</i>	Bat 31	463	MG923574.2	96,75	<i>Alphacoronavirus</i>
<i>Myotis daubentonii</i>	Bat 34	439	KT894889.1	87,66	<i>Astroviridae</i> , не классифицирован, предп. новый род
<i>Pipistrellus nathusii</i>	Bat 16	463	KC243390.1	98,35	<i>Betacoronavirus</i>
		463	EU375869.1	99,51	<i>Alphacoronavirus</i>
<i>Pipistrellus nathusii</i>	Bat 21	464	EU375864.1	98,77	<i>Alphacoronavirus</i>
<i>Pipistrellus nathusii</i>	Bat 23	463	EU375869.1	99,51	<i>Alphacoronavirus</i>
<i>Pipistrellus nathusii</i>	Bat 33	463	EU375864.1	98,77	<i>Alphacoronavirus</i>
		463	KC243390.1	98,35	<i>Betacoronavirus</i>
Не определён	Bat 36	528	KY502400.1	91,11	<i>Alphacoronavirus</i>
		463	GQ259968.1	96,22	<i>Betacoronavirus</i>

вирусы, у 2 особей — астровирусы. В фекалиях 3 летучих мышей обнаружили как альфа-, так и бетакоронавирусы, а в фекалиях 5 особей — только альфако-
ронавирусы. В некоторых образцах удалось обнаружить последовательности, относящиеся к двум разным родам коронавирусов. В образцах № 16, № 33, № 36 выявлены контиги, относящиеся к альфа- и бетакоронавирусам, а в образце № 30 — два контига, относящиеся к различным родам альфакоронавирусов.

Астровирусы удалось выявить среди родов *Myotis dasycneme* и *Myotis daubentonii*, только альфакоронавирусы среди *Pipistrellus nathusi*, *Myotis brandtii*, и *Myotis daubentonii*, одновременно альфа- и бетакоронавирусы у *Pipistrellus nathusii*. У особей видов *M. brandtii*, *N. noctula*, *Pl. auritus*, *V. murinus* по результатам сборки не было обнаружены последовательности вирусов.

Выводы. В данном исследовании мы провели анализ вирусов в фекалиях наиболее распространённых видов летучих мышей, обитающих на территории Звенигородской ЗБС (7 видов рукокрылых). Мы обнаружили вирусы семейств *Coronaviridae* и *Astroviridae*. Таксономическая принадлежность коронавирусов была определена до уровня рода. Наши результаты показывают, что одна летучая мышь может являться носителем нескольких видов коронавирусов, в том числе принадлежащих к разным родам (на примере 4 особей из нашего исследования). Таким образом, летучие мыши Московской области являются носителями патогенов, обладающих пандемическим потенциалом.

Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (номер договора 20-04-60561\20). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Moratelli R., Calisher C. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015. Vol. 110. P. 1–22. doi: 10.1590/0074-02760150048. PMID:25742261; PMCID:PMC4371215
2. Letko M., Seifert S., Olival K., Plowright R., Munster V. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. Vol. 18. P. 461–471. doi: 10.1038/s41579-020-0394-z. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32528128; PMCID: PMC7289071.
3. Zhou P., Yang X., Wang X., Hu B., Zhang L., Zhang W. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020. Vol. 579. P. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32015507; PMCID: PMC7095418
4. Kohl C., Kurth A. European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. *Viruses*. 2014. Vol. 13. P. 3110–3128. doi: 10.3390/v6083110. PMID: 25123684; PMCID: PMC4147689
5. Phelps K., Alhmoud N., Ali S., Bilgin R., Sidamonidze K., Urushadze L. et al. Bat Research Networks and Viral Surveillance: Gaps and Opportunities in Western Asia. *Viruses*. 2019. Vol. 11. P. 240. doi: 10.3390/v11030240. PMID: 30857374; PMCID: PMC6466127 *Viruses* 2019, 11, 240



КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.А. Кошкарina, О.В. Ковалишена, Н.В. Саперкин, А.А. Каплина

ФГБОУ ВО «Поволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород

Ключевые слова: внебольничная пневмония, пневмококк, микоплазма, вспышка, диагностика

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-47>

CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND ETIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN HOSPITALIZED CHILDREN IN NIZHNY NOVGOROD OBLAST

E.A. Koshkarina, O.V. Kovalishena, N.V. Saperkin, A.A. Kaplina

Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

Key words: community-acquired pneumonia, pneumococci, outbreak, diagnostics

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-47>

Введение. Проблема внебольничных пневмоний (ВП) обусловлена высокой заболеваемостью, низким качеством этиологической расшифровки случаев и неадекватной антибиотикотерапией.

Цель исследования. Оценка микробного пейзажа ВП у детей, госпитализированных в инфекционные стационары и ОРИТ Нижнего Новгорода.

Материалы и методы. Оперативный эпидемиологический анализ осуществлялся за пациентами инфекционных стационаров (106 детей всех возрастов с подтверждённым рентгенологически диагнозом ВП). Материал для лабораторного исследования — назофарингеальные мазки, моча. Использовали RT-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией и иммунохроматографический экспресс-тест (ИХА). Применялись эпидемиологические описательно-оценочные методы исследования, стандартные методы вариационной статистики, с применением MS Excel, SPSS.

Результаты. Среди госпитализированных пациентов преобладали девочки (54%). Средний возраст составил $80,07 \pm 6,47$ месяцев, наибольший удельный вес пациентов приходился на возраст 5–6 лет. Пациенты (81 человек), госпитализированные с ВП, были протестированы на наличие в моче растворимого антигена (АГ) *S. pneumoniae* с использованием теста Binax®. У 13,6% пациентов

тест был положительным, у 86,4% пациентов ИХА показал отрицательный результат. Среди пациентов с положительным тестом ВП клинически протекала более тяжело (острое начало с ознобом, фебрильная лихорадка, боль в грудной клетке, кашель, резко выраженная интоксикация), также в эту группу входили пациенты из ОРИТ. По результатам молекулярно-биологического исследования респираторного материала у 79 пациентов с рентгенологически подтверждённой ВП установлено, что в 7,89% обнаружена ДНК *M. pneumoniae*, в 2,63% тест оказался невалидным, в 89,47% образцов ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* не обнаружены. У большей части пациентов с положительным результатом выявления ДНК *M. pneumoniae* клиника характеризовалась частым мучительным и продолжительным кашлем с плохо отделяемой вязкой мокротой, болью в грудной клетке, обструктивным синдромом, без резко выраженной интоксикации. В исследуемой группе пациентов выявлено 2 вспышки микоплазменной инфекции (по 2 и 4 человека в каждой).

Выводы. Для постановки точного заключительного диагноза ВП с учетом клиники и рентгенодиагностики рекомендуется долабораторная дифференциальная диагностика (ИХА для выявления АГ *S. pneumoniae* и ПЦР для выявления ДНК *M. pneumoniae*), что увеличит на $16,04 \pm 2,36\%$ долю этиологически расшифрованных ВП и приведёт к рациональной стартовой антибиотикотерапии.



ИЗМЕНЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ ОСНОВНЫХ ПОДТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ИНФЕКЦИИ

Е.Н. Кудрявцева¹, Т.А. Семенов², М.И. Корабельникова¹, Я.В. Панасюк³, С.Н. Кузин³

¹ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва;

²ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

³ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В исследуемой когорте преобладали подтипы 1b и 3a ВГС — 47,7% и 38,9% соответственно. Генотип 2 ВГС выявлен у 7,2% и подтип 1a ВГС у 5,8%, и у 0,4% пациентов генотипическая принадлежность ВГС не определена. Зафиксированы различия в частоте определения подтипов 1b и 3a ВГС у мужчин и женщин. У мужчин подтип 3a ВГС определяли в 44,8% случаев, тогда как у женщин — в 31,7% ($p < 0,01$) случаях. Частота определения 1b подтипа ВГС составляла 55,0%, что выше ($p < 0,01$), чем у мужчин — 41,8%.

Ключевые слова: генотипы/подтипы ВГС, система эпидемиологического надзора

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-49>

THE IMPORTANCE OF ANTI-HCV SCREENING IN PATIENTS OF LARGE MULTIFIELD HOSPITALS

Е.Н. Kudrjajtseva¹, М.И. Korabelnikova¹, Т.А. Semenenko², Ya.V. Panasyuk³, S.N. Kuzin³

¹Moscow Regional Research Clinical Institute named after M.F. Vladimirovsky (MONIKI), Moscow, Russia;

²N.F. Gamaleya NRCM, Moscow, Russia;

³Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

In the studied cohort, HCV subtypes 1b and 3a prevailed — 47,7% and 38,9%, respectively HCV genotype 2 was detected in 7,2% of cases and HCV subtype 1a — in 5,8% of cases. HCV genotype was not determined in 0,4% of patients. Difference between a frequency of detection of subtypes 1b and 3a of HCV in men and women were recorded. Subtype 3a HCV was determined in men in 44,8% of cases, and in women — in 31,7% of cases ($p < 0.01$). HCV subtype 1b in women was determined with a higher frequency (55,0%, $p < 0,01$), than in men (41,8%).

Key words: HCV genotypes/subtypes, epidemiological surveillance system

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-49>

Введение. Вирус гепатита С (ВГС), согласно современной классификации, представлен семью генотипами и множеством субтипов в рамках каждого генотипа. Актуальность определения многолетних тенденций изменения структуры генотипов/подтипов ВГС у различных групп взрослых пациентов с хроническим гепатитом С обусловлена необходимостью прогностической оценки групп риска

для дальнейшего совершенствования системы эпидемиологического надзора, в связи с необходимостью повышения качества диагностики гепатита С, и может быть использована при прогнозировании эволюции эпидемического процесса этого заболевания.

Цель исследования. Определение структуры генотипов/подтипов ВГС, а также многолетних тенденций её изменений у различных групп взрослых пациентов с хроническим гепатитом С, выделенных по гендерному и возрастному признакам.

Материалы и методы. Анкетные данные пациентов получены из медицинской информационной системы МОНИКИ «Эверест» (ЗАО «АИТ-холдинг»), с последующим импортом в специально созданную базу данных MS Access для исключения повторного учёта пациентов при их последующих обращениях. С помощью этой базы данных сформированы группы пациентов по гендерному и возрастному признакам. В выделенных возрастных группах пациентов (до 30 лет, 30–45 лет и старше 45 лет) соотношение количества пациентов составляло 15,4%, 53,1%, 31,6% (мужчины) и 13,9%, 37,4%, 48,7% (женщины). Определение генотипов/подтипов ВГС осуществляли методом ПЦР с помощью наборов реагентов «ОТ-Гепатоген-С Генотип», ООО «НПО ДНК-технология» с использованием системы для детекции ПЦР-продуктов в режиме реального времени iQ5 (ООО «Био-Рад Лаборатории»). Величины биномиальных доверительных интервалов рассчитывали «точным методом» Клоппера–Пирсона. Многолетнюю динамику показателей оценивали с помощью расчёта величины тенденции методом наименьших квадратов. Достоверность различий показателей сравниваемых групп оценивали с помощью расчёта χ^2 .

Результаты. Наибольший удельный вес у взрослых пациентов с хроническим гепатитом С, зарегистрированных в Московской области, зафиксирован у подтипов ВГС 1b и 3a — 47,7% и 38,9%. Генотип 2 ВГС выявлен у 7,2% и подтип 1a ВГС — у 5,8% пациентов. Еще у 0,4% пациентов идентифицировать генотипическую принадлежность ВГС с помощью используемых наборов реагентов не удалось. Можно констатировать, что исследуемая когорта пациентов характеризуется выраженным преобладанием двух подтипов ВГС, чей суммарный удельный вес составлял 86,6%. Полученные данные подтверждают главную закономерность распределения подтипов ВГС в популяции инфицированных лиц, выявленную на самом раннем (1995–1996 гг.) этапе изучения данной проблемы в России, согласно которой эти подтипы ВГС также составляют подавляющее большинство, но со значительно большим преобладанием подтипа 1b ВГС.

Разделение по гендерному признаку всей когорты пациентов позволило выявить некоторые отличия в распределении подтипов ВГС как между сравниваемыми группами пациентов, так и внутри групп. Можно отметить

выраженное преобладание 1b генотипа среди женщин (55,0%) и генотипа 3a/b среди мужчин 44,8%.

Выделение трёх возрастных групп в изучаемых когортах пациентов мужчин и женщин позволило провести анализ частоты определения подтипов 1b и 3a ВГС в пределах одной когорты, а также в сравнении между отдельными возрастными группами. Значительный интерес представляет выявление наличия и оценки различий в динамике рассчитанных показателей для каждой возрастной группы (таблица).

Следует отметить преобладание 1b подтипа среди группы женщин старше 45 лет (69,7%), подтип 3a преобладает среди пациентов-мужчин от 30 до 45

Распределение подтипов ВГС в динамике по гендерному признаку для каждой возрастной группы

Подтип 1b ВГС								
Группы пациентов/годы	Среднее значение	2008–09 годы	2010–11 годы	2012–13 годы	2014–15 годы	2016–17 годы	2018 год	Т (% за 2 года)
Женщины до 30 лет	42,0	40,4	37,2	45,1	44,8	40,8	42,0	+1,0%
Женщины 30–45 лет	40,7	50,0	46,2	44,4	38,1	37,9	38,2	–4,9%
Женщины старше 45 лет	69,7	72,2	74,5	69,0	70,6	68,8	65,7	–1,5%
Мужчины до 30 лет	35,5	33,3	36,0	35,6	33,2	39,3	38,9	+2,1%
Мужчины 30–45 лет	34,7	40,8	33,7	32,5	35,8	34,7	33,7	–2,2%
Мужчины старше 45 лет	56,8	64,5	56,6	61,1	58,7	55,5	48,5	–3,2%
Подтип 3a ВГС								
Женщины до 30 лет	44,4	50,6	49,1	37,6	42,5	44,6	39,1	–3,1%
Женщины 30–45 лет	45,8	36,2	42,3	40,5	49,9	46,3	50,0	+4,8%
Женщины старше 45 лет	17,2	14,6	13,2	16,1	16,8	18,8	20,5	+6,3%
Мужчины до 30 лет	50,5	52,8	52,2	52,1	51,2	44,8	44,4	–2,9%
Мужчины 30–45 лет	52,2	44,0	51,7	55,6	51,8	51,0	53,8	+1,7%
Мужчины старше 45 лет	29,4	15,5	29,0	25,3	28,7	31,5	36,9	+9,3%

лет. Наблюдается тенденция выраженного роста выявления подтипа 3а среди мужчин старше 45 лет ($T + 9,3\%$).

Средняя частота выявления подтипа 1b ВГС у женщин и мужчин отдельных возрастных групп существенно различалась. С максимальной частотой этого подтипа ВГС инфицированы пациенты старших возрастных групп: в 69,7% случаев женщины и в 56,8% — мужчины. При этом подтип 1b ВГС у пациентов-женщин возрастных групп до 30 и 30–45 лет определяли с существенно меньшей частотой (42,0% и 40,7% соответственно), чем у мужчин (35,5% и 34,7% соответственно).

Обращают на себя внимание различия в частоте определения подтипов 1b и 3а ВГС среди пациентов до 30 и старше 45 лет. Так, подтип 1b ВГС чаще определяли у пациентов старше 45 лет, как женщин, так и мужчин. В группе женщин старше 45 лет средняя частота определения подтипа 1b ВГС составила 69,7%, что выше ($p < 0,05$), чем у пациенток до 30 лет — 42,0%. Следует отметить, что различия в удельном весе подтипа 1b ВГС у пациенток до 30 лет и старше 45 были достоверны в каждый временной интервал (2 года).

Аналогичная ситуация имела место в этих же возрастных группах мужчин — в группе пациентов старше 45 лет подтип 1b ВГС определяли чаще, чем в группе до 30 лет ($p < 0,05$). Средние показатели у пациентов этих возрастных групп за период наблюдения составляли соответственно 56,8% и 35,5%. Так же, как и у женщин в течение всего периода наблюдения, подтип 1b ВГС у мужчин старше 45 лет определяли чаще, чем у пациентов до 30 лет.

Подтип 3а ВГС с наибольшей частотой определяли у пациентов до 30 лет. В среднем у мужчин этот подтип ВГС определен в 50,5% случаев, у женщин — в 44,4%. В группах пациентов старшей возрастной группы, как мужчин, так и женщин, средняя частота определения подтипа 3а ВГС была минимальной — 29,4% и 17,2% соответственно.

Выводы. На основании полученных данных можно констатировать, что подтипы 1b и 3а по-прежнему составляют подавляющее большинство среди популяции инфицированных лиц в России. Зафиксированы различия в частоте определения подтипов 1b и 3а ВГС у мужчин и женщин. У мужчин подтип 3а ВГС определяли в 44,8% случаев, тогда как у женщин — в 31,7% ($p < 0,01$). У женщин частота определения 1b подтипа ВГС составляла 55,0%, что выше ($p < 0,01$), чем у мужчин — 41,8%. При изучении распределения генотипов ВГС по возрастному признаку можно констатировать, что рассчитанные показатели выявления подтипов ВГС различны для каждой возрастной группы. Так, выделение подтипа 1b ВГС превалировало в возрастной группе старше 45 лет, в то время как подтип 3а ВГС чаще был выявлен у мужчин и женщин в возрасте до 30 лет и от 30 до 45 лет.



НОСИТЕЛЬСТВО ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У СОТРУДНИКОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, Н.К. Фурсова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, гены бета-лактамаз, интегроны
классов 1 и 2

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-53>

CARRIAGE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA AND ANTIBACTERIAL RESISTANCE GENES OF MICROBIOLOGY LABORATORY STAFF

E.S. Kuzina, T.S. Novikova, N.K. Fursova

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russia

Key words: antibiotic resistance, beta-lactamase genes, integrons of classes 1 and 2

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-53>

Введение. Проблема антибиотикорезистентности в настоящее время — одна из самых серьёзных в здравоохранении. Оценка распространённости носительства потенциально опасных бактерий и генов антибиотикорезистентности играет важную роль для клиницистов при разработке мер профилактики и сдерживания распространения антибиотикорезистентности.

Цель исследования. Выявление грамотрицательных бактерий (ГОб) и генов антибиотикорезистентности у сотрудников микробиологической лаборатории.

Материалы и методы. Клинические штаммы ГОб ($n = 100$) бактерий выделены из зева ($n = 13$) и фекалий ($n = 87$) 30 здоровых сотрудников ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk. Бактерии культивировали при температуре 37 °C на бульоне и агаре Мюллера–Хинтон (Himedia, Мумбаи, Индия) без антибиотиков и с ампициллином (50 мг/л). Видовую идентификацию проводили на приборах VITEK-2 (Biomérieux, Франция) и MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Методом ПЦР-РВ детектировали интегроны классов 1 и 2 и гены бета-лактамаз (bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{OXA-48} и bla_{VIM}). Первичную структуру генов определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Секвенированные нуклеотидные последовательности размещали в базах данных GenBank и INTEGRALL.

Результаты. В коллекции определено 18 видов ГОб: *Escherichia* spp. ($n = 48$), *Klebsiella* spp. ($n = 29$), *Enterobacter* spp. ($n = 8$), *Citrobacter* spp. ($n = 4$), *Pseudomonas* spp. ($n = 3$), *Acinetobacter junii* ($n = 2$), *Kluyvera cryocrescens*

($n = 1$), *Comamonas kerstersii* ($n = 1$), *Raoultella ornithinolytica* ($n = 1$), *Proteus mirabilis* ($n = 1$), *Providencia rettgeri* ($n = 1$) и *Stenotrophomonas maltophilia* ($n = 1$). У 34% изолятов определен ген bla_{CTX-M} , у 20% — уены bla_{TEM} и bla_{OXA-48} , у 19% — bla_{SHV} . Интегроны класса 1 выявлены у 39% штаммов, вариабельная часть которых представлена наборами генных кассет *dfrA17-aadA5*, *dfrA7*, *dfrA21*, *aadA1-dfrA1-orfC*; интегроны класса 2 — у 5% штаммов, вариабельная часть: *dfrA1-sat2-aadA1*.

Выводы. Описаны резистомы ГОБ, выделенные от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории: более чем у 1/3 детектированы эпидемически значимые гены цефалоспориназы, у 1/5 — гены пенициллиназ и карбапенемаза bla_{OXA-48} -типа, почти у половины штаммов — интегроны классов 1 и 2. Интересно, что наиболее представленными родами явились *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp., относящиеся к числу патогенов-лидеров, способных вызывать госпитальные инфекции у человека.

Исследование выполнено в рамках отраслевой НИР Роспотребнадзора.



КОМПЕНСАТОРНЫЕ МУТАЦИИ В *rpoABC* ГЕНАХ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И ИХ РОЛЬ В ТРАНСМИССИИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ

М. Малахова, Д. Беспярых, А. Гуляев, Ю. Беспярых, Е. Шитиков

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФХМ ФМБА России, Москва

Ключевые слова: компенсаторные мутации, полногеномное секвенирование, туберкулёз

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-55>

COMPENSATORY MUTATIONS IN THE *rpoABC* GENES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND THEIR ROLE IN THE TRANSMISSION OF DRUG RESISTANT FORMS

M. Malakhova, D. Bespyatykh, A. Guliaev, J. Bespyatykh, E. Shitikov

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Key words: compensatory mutations, whole genome sequencing, tuberculosis

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-55>

Введение. Во всем мире туберкулёз (ТБ), вызываемый микобактериями туберкулёзного комплекса, является одной из 10 основных причин смертности населения. Несмотря на снижение заболеваемости активной формой, ситуация остается критической из-за частого обнаружения лекарственно-устойчивых изолятов. При этом считается, что основной причиной распространения ТБ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ соответственно) является схожесть в жизнеспособности устойчивых и чувствительных форм патогена. Восстановление жизнеспособности может происходить за счёт следующих механизмов: 1) эпистатический эффект лекарственно-ассоциированных мутаций; 2) появление компенсаторных мутаций.

Цель исследования. В представленной работе был проведён поиск новых компенсаторных мутаций в генах *rpoABC* *M. tuberculosis* и оценён их возможный вклад в распространение устойчивых форм микроорганизма.

Материалы и методы. В анализе было использовано 9000 образцов *M. tuberculosis* (МТБ), загруженных в виде чтений с приборов высокопроизводительного секвенирования. Поиск SNPs проводился с использованием программных пакетов snippy и breseq. Геном штамма H37Rv (NC_000962.3) был выбран в качестве референсного. Основные филогенетические линии были определены на основании SNPs и филогенетического анализа.

Результаты. По результатам исследования выборка содержала образцы всех известных филогенетических линий патогена: (L1, $n = 778$ (8,6%); L2, $n = 2855$ (31,7%); L3, $n = 1180$ (13,1%); L4, $n = 4109$ (45,7%); L5, $n = 42$; L6, $n = 32$; L7, $n = 4$). Значительная часть образцов коллекции (4801 из 9000; 53,3%) содержала мутации, ассоциированные с устойчивостью хотя бы к одному антибиотику, 2430 несли устойчивость к рифампицину. Суммарно были обнаружены 102 возможные компенсаторные мутации: 7 в гене *rpoA*, 30 в *rpoB*, 65 в *rpoC*. Из них 10 полиморфизмов не были описаны ранее.

Выводы. Согласно филогенетическому анализу, МЛУ формы туберкулёза не образовывали больших кластеров и большее их количество по сравнению с чувствительными формами. При этом для образцов из стран с высокой представленностью устойчивых форм патогена, в том числе и для российской популяции микроорганизма, был обнаружен противоположный эффект.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00686.



КОМОРБИДНОСТЬ ТУБЕРКУЛЁЗА И МИКОБАКТЕРИОЗА У БОЛЬНЫХ НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ С ИММУНОДЕФИЦИТОМ

В.Ю. Мишин^{1,2,3}, А.В. Мишина^{1,3}, А.Э. Эргешов², В.В. Романов², А.Л. Собкин³

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва;

²Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза, Москва;

³Туберкулёзная клиническая больница № 3 имени профессора Г.А. Захарьина, Москва

Ключевые слова: туберкулёз, микобактериоз, ВИЧ-инфекция, оппортунистические инфекции, микробиологическая диагностика, молекулярно-генетическая диагностика, лучевая диагностика

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-57>

THE COMORBIDITY OF TUBERCULOSIS AND MYCOBACTERIOSIS AT ADVANCED STAGES OF HIV INFECTION WITH IMMUNODEFICIENCY

V.Y. Mishin^{1,2,3}, A.V. Mishina^{1,3}, A.E. Ergeshov², V.V. Romanov², A.L. Sobkin³

¹A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

²Central TB Research Institute, Moscow, Russia;

³Professor G.A. Zakharyin TB Clinical Hospital No. 3, Moscow, Russia

Key words: TB, mycobacteriosis, HIV infection, opportunistic infection, microbiological diagnosis, molecular-genetic diagnosis, radiological diagnosis

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-57>

Введение. Коморбидность туберкулёза (ТБ) и микобактериоза (МБ) у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции с иммунодефицитом (ИД) практически не изучена.

Цель исследования. Изучить коморбидность ТБ и МБ у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции с ИД.

Материалы и методы. Обследовано 26 больных ТБ и МБ, с 4В стадией ВИЧ-инфекции в фазе прогрессирования, без антиретровирусной терапии, в возрасте 26–54 лет (основная группа). При микробиологическом и молекулярно-генетическом исследованиях выявлены микобактерии туберкулёза (МБТ) и нетуберкулёзные микобактерии (НТМ). Видовую принадлежность НТМ устанавливали путем молекулярно-генетической идентификации с использованием ДНК-стрипов Hain Lifescience (Германия) GenoType® Mycobacterium CM и GenoType® Mycobacterium AS. *M. aviumcomplex* были выявлены у 22 (84,6 ± 7,1%) пациентов, *M. kansasii* — 2 (7,7 ± 5,2%), *M. fortuitum* — 1 (3,8 ± 3,8%) и *M. xenopi* — 1 (3,8 ± 3,8%). Группу сравнения составили также 26 больных

ТБ, идентичные по всем параметрам с основной группой. В основной группе среднее количество CD4+ лимфоцитов составляло $15,0 \pm 0,35$ кл./мкл крови, а в группе сравнения — $23,3 \pm 0,44$ кл./мкл ($p > 0,05$).

Результаты. Больные обеих групп употребляли наркотики и страдали вирусным гепатитом С или В. Длительность ВИЧ-инфекции составляла 6–9 лет. Клиническая картина в обеих группах характеризовалась синдромом интоксикации, бронхолёгочными проявлениями и симптомами поражения других органов и систем. ТБ имел генерализованный характер, и были другие оппортунистические инфекции (ОИ). Кандидоз лёгких, слизистых оболочек и кожи был у 6 ($23,1 \pm 8,2\%$) пациентов основной группы и у 8 группы сравнения, герпес-вирусная инфекция, соответственно, у 8 и у 4; цитомегаловирусная инфекция, соответственно, у 12 и у 4; и пневмоцистная пневмония, соответственно, у 6 и 3. При КТ органов грудной клетки у больных обеих групп визуализировался диссеминированный процесс в лёгких.

Выводы. Коморбидность ТБ и МБ у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции с ИД характеризуется тяжёлыми клиническими проявлениями, генерализацией туберкулёза и наличием нескольких ОИ. На КТ органов грудной клетки диагностируется диссеминированный процесс. Своевременная диагностика возможна только при применении микробиологических и молекулярно-генетических исследований для выявления МБТ, НТМ и возбудителей других ОИ.



ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК *M. TUBERCULOSIS* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.А. Острик, Е.Г. Салина

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, малые некодирующие РНК, маркёры инфекции

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-59>

PERSPECTIVES OF USE *M. TUBERCULOSIS* SMALL NONCODING RNAs FOR TUBERCULOSIS INFECTION DIAGNOSTICS

A.A. Ostriuk, E.G. Salina

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia

Key words: *M. tuberculosis*, snRNAs, infection markers

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-59>

Введение. Малые некодирующие РНК играют важную роль в регуляции метаболизма *M. tuberculosis*. Имеется ряд указаний на то, что малые РНК *M. tuberculosis* могут секретироваться во внешнюю среду и быть специфическим маркёром инфекции, что открывает перспективы их использования для диагностики туберкулёза наряду с другими молекулярно-генетическими мишенями, позволяющими детектировать и прогнозировать течение этого заболевания. Известно, что уровень экспрессии малых РНК *M. tuberculosis* MTS0997 и MTS1338 нарастает при переходе в стационарную фазу роста *in vitro*, в модели инфекции мышей и в покоящемся состоянии *M. tuberculosis*. Мы полагаем, что MTS0997 и MTS1338 могут являться одними из маркёров для диагностики туберкулёзной инфекции.

Цель исследования. Установить роль малых некодирующих РНК MTS0997 и MTS1338 в выживаемости *M. tuberculosis* в условиях стресса, моделирующего воздействие, которому микобактерии подвергаются со стороны организма-хозяина при инфекции.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией малых РНК MTS0997 и MTS1338. Исследовали влияние следующих стрессовых факторов на выживаемость клеток полученных штаммов: оксида азота, пероксида водорода, кислой среды, длительной нехватки питательных веществ, а также при инфицировании микобактериями культуры клеток макрофагов клеточной линии THP-1.

Результаты. При гиперэкспрессии малой некодирующей РНК MTS1338 было выявлено повышение устойчивости клеток *M. tuberculosis* к воздействию окислительного и нитрозативного стресса, пониженной кислотности среды, а также длительному голоданию. Кроме того, обнаружено повышение выживаемости клеток *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией MTS1338 при инфекции ими макрофагов.

Выводы. Влияние гиперэкспрессии малой РНК 1338 на выживаемость *M. tuberculosis* в стрессовых условиях позволяет сделать предположение о возможной её роли в течении туберкулёзной инфекции, в том числе в процессе персистирования микобактерий в иммунных клетках хозяина. Таким образом, уровень экспрессии малой РНК MTS1338 может являться диагностическим маркёром форм туберкулёза, связанных с длительным персистированием микобактерий в организме.

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 18-15-00332).



ВТОРОЙ ЭТАП АКТУАЛИЗАЦИИ КАДАСТРА СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ ПУНКТОВ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

К. Петремгвдlishvili¹, С.А. Сабурова¹, М.Н. Локтионова^{1,2}, С.Р. Раичич¹, В.И. Ладный¹, Е.Г. Симонова², Т.А. Чеканова¹

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)», Москва

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно неблагополучный пункт, эпидемиологический надзор

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-61>

THE SECOND STAGE OF UPDATING THE INVENTORY OF STATIONALLY ADVERSE POINTS FOR ANTHRAX IN THE NORTH-WESTERN FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION

K. Petremgvdlishvili, ¹ S.A. Saburova¹, M.N. Loktionova^{1,2}, S.R. Raichich¹, V.I. Ladnyi¹, E.G. Simonova², T.A. Chekanova¹

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, Russia

Key words: anthrax, permanently disadvantaged item, epidemiological surveillance

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-61>

Введение. Анализ проявлений активности стационарно неблагополучных пунктов (СНП) по сибирской язве и актуализации кадастра СНП — неотъемлемое условие объективной оценки рисков осложнения эпидемиологической ситуации по сибирской язве на определённых территориях. В Северо-Западном федеральном округе (СЗФО) в XIX и XX веках регистрировались вспышки сибирской язвы среди людей и животных.

Цель исследования. Анализ результатов второго этапа актуализации кадастров СНП в 11 регионах СЗФО.

Результаты. По данным кадастра 2005 года в СЗФО, за исключением г. Санкт-Петербурга, учтены 1713 СНП. В XIX в. был зарегистрирован 781 случай заболевания сибирской язвы у человека/животных, в XX веке — 2532 случая. Некоторые СНП, расположенные в Псковской, Ленинградской, Архангельской, Новгородской областях и республике Карелия, характеризовались неоднократным проявлением активности по сибирской язве — от 2 до 9 раз. Нельзя не отметить территорию неутончённых моровых полей: в Нарьян-Мар-

ском районе Ненецкого автономного округа вспышки регистрировались 329 раз, в Усинском районе Коми — 36 раз. На основании данных, поступивших из управлений Роспотребнадзора, было выявлено снижение количества СНП СЗФО до 1521. Большая их часть расположена в Новгородской (775), Вологодской (538), Ленинградской (100) и Псковской (86) областях. Для всех СНП определены географические координаты. Уточнены названия СНП и их административный статус.

Выводы. Исследование позволило актуализировать сведения по СНП в СЗФО для перехода к следующему этапу — их картированию с применением геоинформационных технологий.



МОНИТОРИНГ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ШТАММОВ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ В ПЕРИОД С 2015 ПО 2019 г.

О.А. Петруша¹, Е.Р. Корчевая¹, Е.Р. Мескина², И.Ю. Исаков¹, А.А. Никонова¹,
Е.Б. Файзулов¹

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва;

²ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва

Ключевые слова: ротавирусы группы А, ротавирусная инфекция, G/P-генотипирование

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-63>

MONITORING OF CHANGES IN THE GENETIC STRUCTURE OF ROTAVIRUS STRAINS CIRCULATING IN THE MOSCOW REGION FROM 2015 TO 2019

O. A. Petrusha¹, E.R. Korchevaya¹, E.P. Meskina², I.I. Isakov¹, A.A. Nikonova¹,
E.B. Faizuloev¹

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

²Moscow Regional Research Clinical Institute named after M.F. Vladimirsky, Moscow, Russia

Key words: rotavirus A, rotaviral enteritis, rotavirus G/[P] genotype

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-63>

Введение. Ротавирусы группы А (РВА) являются наиболее распространённой причиной тяжёлых диарейных заболеваний у детей младшего возраста во всём мире. Эпидемиологический мониторинг и исследование биологического разнообразия РВА помогает устанавливать источник возбудителя, пути распространения инфекции, оценивать и прогнозировать эффективность вакцинопрофилактики.

Цель исследования. Мониторинг РВА разных G/[P]/I-генотипов, циркулировавших в московском регионе в период с 2015 по 2019 г.

Материалы и методы. Образцы фекалий детей, госпитализированных в 2015–2019 гг. с симптомами ОКИ, предоставлены МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (ГБУЗ города Москвы «Детская городская клиническая больница святого Владимира ДЗМ»). Для подтверждения наличия в образцах РНК РВА и генотипирования выявленных штаммов РВА ($N = 111$) использовали наборы реагентов на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), как описано в работе V. Kiseleva с соавторами (Virologica Sinica, 2018).

Результаты. В результате проведённого исследования определена генетическая структура исследованных штаммов РВА: G9P[8]I1 — 41%, G3P[8]

I2 (DS-1-подобный штамм) — 20%, G4P[8]I1 — 18%, G2P[4]I2 — 12%, G1P[8]I1 — 4%, G3P[8]I1 — 2%. 3% случаев, типированных только по гену Р, относятся к варианту гена Р[8]. Также были обнаружены единичный случай смешанной инфекции двумя генотипами (G9P[8]I1 и G2P[4]I2) и редкий штамм G4P[6]I1, филогенетически родственный штаммам РВА, выделенным от свиней. Особый интерес представляет штамм G3P[8]I2, впервые выявленный нами в 2018 г., доля которого к осени 2019 г. среди всех выявленных РВА составляла 32%. Это ставит его на второе место по встречаемости после G9P[8] (35% в 2019 г.). По результатам секвенирования и BLAST-анализа штамм G3P[8]I2 является родственным реассортантному штамму, широко распространившемуся в последние годы на территории Европы и Азии. Данный штамм имеет DS-1-подобную констелляцию генов, за исключением гена белка VP7, предположительно имеющего происхождение от штамма ротавируса лошадей.

Выводы. В период с 2015 по 2019 г. структура циркулирующих в московском регионе штаммов РВА значительно изменилась в результате появления в 2018 г. штамма с генотипом G3P[8]I2, доля которого в 2019 г. достигла 32%, тогда как доля G4P[8], доминировавшего до 2014 г., в 2019 г. снизилась до 9,3%.



УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОКОЛОНИЙ *MYCOPLASMA HOMINIS*

О.В. Побегуц¹, В.Г. Ладыгина¹, А.И. Zubov, Г.А. Лёвина², О.И. Бархатова²,
С.И. Ковальчук³, Р.К. Зиганшин³, Д.В. Евсютина, Г.Ю. Фисунов¹, И.В. Раковская²

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины»
ФХМ ФМБА России, Москва;

²ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

³ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва

Ключевые слова: патогены урогенитального тракта человека, *Mycoplasma hominis*, ВЭЖХ-МС, тимидинфосфорилаза

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-65>

ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PROTEOMIC ANALYSIS OF MICROCOLONIES *MYCOPLASMA HOMINIS*

O.V. Pobeguts¹, V.G. Ladygina¹, A.I. Zubov, G.A. Levina², O.I. Barhatova², S.I. Kovalchuk³,
R.K. Ziganshin³, D.V. Evsyutina, G.Yu. Fisunov¹, I.V. Rakovskaya²

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

²N.F. Gamaleya NRCEM, Moscow, Russia;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: human urogenital tract pathogens, *Mycoplasma hominis*, HPLC-MS, thymidine phosphorylase

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-65>

Введение. *Mycoplasma hominis* относится к классу Молликут и является патогеном человека, вызывающим острые и хронические инфекции урогенитального тракта. Из сыворотки крови пациентов с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта культуральным методом были выделены колонии *M. hominis* неизвестного морфологического типа, названные мини-колониями (МК). МК отличаются от классических колоний (КК) морфологией, очень маленьким размером (КК — 100–300 мкм, МК — 7–9 мкм), значительным замедлением роста и устойчивостью к различным неблагоприятным факторам. Тестирование диско-диффузионным методом чувствительности КК и МК к антибиотикам, обычно используемым для лечения инфекций, вызванных *M. hominis*, показало, что МК были устойчивы ко всем использованным антибиотикам, в отличие от КК.

Цель исследования. Сравнить протеомные профили МК и КК для выяснения причин устойчивости МК к антибиотикам.

Методы. ВЭЖХ-МС анализ был выполнен на системе Ultimate 3000 RSLC nano HPLC, подключенной к масс-спектрометру QExactive Plus (ThermoFisher Scientific).

Результаты. Сравнительный протеомный анализ методом ВЭЖХ-МС показал, что в МК, по сравнению с КК, наблюдается падение уровня белков, участвующих в процессах репликации, трансляции, деления и синтеза АТФ, что свидетельствует о торможении основных клеточных процессов и переходе клетки в состояние энергетического дефицита. Падение уровня ферментов гликолиза и аргинин-дегидролазного пути, с одной стороны, и увеличение уровня ферментов тимидинфосфорилазы (deoA) и дезоксирибоза-фосфат-альдолазы (deoC), которые участвуют в катаболизме нуклеозидов, даёт возможность предполагать, что клетки МК используют в качестве источника углерода не простые сахара и аргинин, а фосфорилированные пентозы, которые образуются в результате катаболизма нуклеозидов. Полученный нами мутант со сверхэкспрессией гена deoA, подобно МК, проявлял устойчивость к антибиотикам и имел протеомный профиль, характерный для МК.

Выводы. Таким образом, мы показали, что формирование МК связано с изменением энергетического метаболизма клеток *M. hominis*. Использование фосфорилированных рибоз, образующихся при катаболизме нуклеозидов, даёт возможность клеткам переходить в состояние энергетического дефицита, необходимого для их выживания в условиях стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-75-10124.



ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Н.В. Рыбкина¹, Е.К. Псарева¹, Н.Ф. Тимченко²

¹Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт, филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», Нижний Новгород;
²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, факторы патогенности, инвазин, адгезин, CNFY, Yops

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-67>

STUDY OF PATHOGENICITY FACTORS OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* STRAINS ISOLATED FROM MAMMALS

N. V. Rybkina¹, E. K. Psareva¹, N. F. Timchenko²

¹Nizhny Novgorod Research Institute - branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia;
²Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, pathogenicity factors, invasin, adhesin, CNFY, Yops

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-67>

Введение. *Yersinia pseudotuberculosis* является грамотрицательным патогеном, который вызывает сапрозоонозные инфекции как у людей, так и у различных животных. Известно, что высоковирулентные штаммы *Y. pseudotuberculosis* вызывают заболевание с особыми клиническими проявлениями, опасное для людей, именуемое дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (ДСЛ). Патоген *Y. pseudotuberculosis* секретирует мембранные везикулы, которые содержат различные белки и факторы патогенности (ФП) в зависимости от штамма. Среди них важное значение имеют факторы вирулентности острой фазы, в том числе адгезин YadA, цитотоксический фактор некроза CNFY, плазмидно-кодируемая система секреции III типа (T3SS) и связанные с ней эффекторы Yop, а также белок инвазин (INV).

Цель исследования. Изучение факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от млекопитающих, в местах распространения штаммов, ассоциированных с ДСЛ.

Материалы и методы. Объектом исследований в работе служили 10 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из коллекции ФГБНУ НИИЭМ имени Г.П. Сомова, выделенные от следующих млекопитающих: грызун ($n = 2$), крыса ($n = 1$), мышь домовая ($n = 2$), свинья ($n = 2$), собака ($n = 1$), крыса серая ($n = 1$), красно-серая

полёвка ($n = 1$). Штаммы исследовали с применением метода ПЦР для обнаружения генов, кодирующих ФП: *cnfY*, *inv*, *yadA*, *yopE*.

Результаты. Обнаружено наличие двух аллелей гена вирулентности *inv*. Аллель 1 гена *inv* был обнаружен у большинства (90%) штаммов, аллель 2 — у одного штамма. Гены *yadA* и *yopE*, кодируемые плазмидой вирулентности (pYV), были обнаружены только у 4 штаммов. Это связано с отсутствием pYV у других 6 штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Для гена *yadA* выявлено содержание только аллеля 1. Для *yopE* преобладающим оказался аллель 2 — выявлен у 3 штаммов, аллель 1 — у одного штамма. Ген *cnfY* выявлен во всех исследуемых штаммах *Y. pseudotuberculosis*, и его размер составлял около 1800 п.н., что соответствует аллелю 1 гена *cnfY*.

Заключение. Скрининг ФП штаммов, ассоциированных с ДСЛ, по источникам литературных данных, подтверждает, что 4 штамма *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от млекопитающих (грызун, крыса, мышь домовая, красно-серая полёвка) в настоящем исследовании, которые содержали все перечисленные ФП, вероятно, являются высоковирулентными.



ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ВИРУСА КЕМЕРОВО НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ О ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ

М.В. Сафонова¹, Е.Г. Симонова², В.Г. Дедков³

¹ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, Москва;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва;

³ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Ключевые слова: вирус Кемерово, орбивирусы, генетическое разнообразие, высокопроизводительное секвенирование, эпидемический потенциал

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-69>

KEMEROVO VIRUS EPIDEMIC POTENTIAL ESTIMATION BASED ON ITS GENETIC DIVERSITY

M.V. Safonova¹, E.G. Simonova², V.G. Dedkov³

¹Federal state healthcare institution «Anti-plague Center» of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia;

²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University) Moscow, Russia;

³Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Key words: *Kemerovo virus, orbiviruses, genetic diversity, high-throughput sequencing, epidemic potential*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-69>

Введение. Применение современных молекулярных методов в изучении инфекций, относящихся к категории новых и возвращающихся, позволяет не только охарактеризовать базовые свойства малоизученных возбудителей, но и оценить степень их эпидемиологической опасности. В этом отношении интересен вирус Кемерово (КЕМВ), входящий в группу вирусов Грейт-Айленд, для определения эпидемического потенциала которого разработана система количественной оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии.

Материалы и методы. В основу системы положена связь эпидемического потенциала с понятием эпидемиологической опасности, формирующей эпидемиологический риск и складывающейся из опасностей источника инфекции, механизма передачи и восприимчивости макроорганизма. В рамках каждого звена эпидемического процесса выделены факторы, ранжированные в соответствии со значимостью с точки зрения реализации эпидемиологического риска с присвоением им балльной оценки. Эпидемический потенциал вируса

определяется суммой баллов по трём категориям, соотношение баллов между ними позволяет оценить ведущий фактор эпидемиологического риска.

Результаты. Согласно разработанным критериям, на основании ранее полученных данных о генетическом разнообразии КЕМV, межвидовых взаимоотношениях в группе Грейт-Айленд и особенностях циркуляции в рамках глобального природного резервуара, эпидемический потенциал вируса оценён как средний и обусловлен широким ареалом распространения вируса, высоким уровнем генетической изменчивости, поливекторностью и способностью транслоцироваться на большие расстояния в отсутствие регистрируемой заболеваемости.

Для апробации оценочной методики определён эпидемический потенциал ряда возбудителей вирусных трансмиссивных и нетрансмиссивных природно-очаговых инфекций, при этом полученные значения соответствуют современным представлениям об их эпидемиологической опасности.

Выводы. Таким образом, оценочная система позволяет количественно представить эпидемический потенциал возбудителя, сравнить показатели различных возбудителей с оценкой ведущего фактора эпидемиологического риска. Система может служить дополнительным инструментом в оценке эпидемиологической опасности в случае угроз возникновения чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера.



ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ И ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI*

П.В. Слукин, Л.В. Колупаева, Н.К. Фурсова

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

Ключевые слова: уропатогенные *Escherichia coli*, гены вирулентности, острова патогенности

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-71>

PATHOGENICITY ISLAND SAND VIRULENCE GENES OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*

P.V. Slukin, L.V. Kolupaeva, N.K. Fursova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Key words: uropathogenic *Escherichia coli*, virulence genes, pathogenicity island

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-71>

Введение. Острова патогенности (ОП) — участки геномов патогенных бактерий, несущие гены факторов патогенности, распространяющиеся путем горизонтального переноса. У уропатогенных *Escherichia coli* (УПЭК) описано три ОП, ассоциированных с уровирулентностью: PAI III536 с генами *sfaS* S-фимбрий и *iroN* сидерофора сальмохелина; PAI IV536 с геном *fyuA* сидерофора иерсиниобактина; PAI ICFT073 с генами *rapG* Р-фимбрий и *iroN* сальмохелина.

Цель исследования. Определить наличие ОП PAI III536, PAI IV536, PAI ICFT073 и ассоциированных генов вирулентности в клинических штаммах УПЭК.

Материалы и методы. Штаммы *E. coli* ($n = 299$) получены из урологических клиник Москвы, Ярославля и Челябинской области, идентифицированы на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Методом ПЦР со специфичными праймерами детектировали ОП PAI III536, PAI IV536 и PAI ICFT073 и гены вирулентности: *sfaS*, *rapGI*, *rapGII*, *rapGIII*, *iroN* и *fyuA*.

Результаты. ОП PAI III536, PAI IV536 и PAI ICFT073 были определены у 2, 76 и 48% изучаемых штаммов УПЭК соответственно. Гены вирулентности *sfaS*, *rapGII*, *rapGIII*, *iroN* и *fyuA* были детектированы у 7, 21, 10, 21 и 76% штаммов соответственно; ген *rapGI* в исследуемой коллекции не выявлен. Совместное присутствие ОП PAI IV536 и гена *fyuA* отмечено у 75% штаммов, а раздельное — у 2% штаммов. Ассоциация ОП PAI III536 и генов *sfaS* и *iroN* зафиксирована у 2% штаммов, а присутствие одного из генов *sfaS* и/или *iroN* — у 23% штаммов. ОП PAI ICFT073 совместно с генами *rapGII*/*rapGIII* и *iroN* определён

у 3% штаммов, совместно с генами *papGII/papGIII* — у 14% штаммов, совместно с геном *iroN* — у 7% штаммов, только PAI ICFT073 — у 23% штаммов, только гены *papGII/papGIII* и *iroN* — у 2% штаммов. У 10% штаммов был детектирован ген *iroN*, при отсутствии ОП PAI III536 и PAI ICFT073.

Выводы. В геномах изучаемых штаммов УПЭК ОП PAI IV536 был преимущественно ассоциирован с геном *fyuA*. Гены *sfaS*, *iroN* и *papGII/papGIII* чаще были идентифицированы в штаммах без ОП. ОП PAI ICFT073 в большинстве охарактеризованных штаммов не был ассоциирован с генами *papGII/papGIII* и *iroN*, в то время как ОП PAI III536 преимущественно содержал хотя бы один ген — *sfaS* и/или *iroN*. Полученные данные позволяют предположить, что горизонтальный перенос генов вирулентности *sfaS*, *papGII*, *papGIII*, *iroN* и *fyuA* может осуществляться как в составе островов патогенности, так и без них.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.



АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* РАЗЛИЧНЫХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ГРУПП

Л.В. Сужаева, С.А. Егорова, М.А. Макарова

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Escherichia coli — облигатный представитель микробиоты кишечника человека, отличающийся широким внутривидовым разнообразием, которое отражается и на чувствительности к антимикробным препаратам (АМП). Вид представлен четырьмя основными филогенетическими группами (A, B1, B2, D). Исследовано 511 штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей в возрасте от 1 месяца до 17 лет. Чувствительность к 15 АМП определена диско-диффузионным методом. Филогенетическая группа штаммов определена в триплекс-ПЦР по методу O. Clermont. Гены, кодирующие β -лактамазы молекулярных классов TEM, SHV, OXA и CTX-M, выявлены методом мультиплексной ПЦР.

Доля штаммов, устойчивых к 1 и более классам АМП, среди *E. coli* филогенетической группы A составляла 26,9%, B1 — 18,9%, B2 — 42,4%, D — 56,2% ($p < 0,001$). Доля полирезистентных (устойчивых к 3 и более классам АМП) составляла 10,2% в группе A; 5,4% в группе B1; 14,7% в группе B2; 29,9% в группе D ($p < 0,001$). Три (TEM, SHV, CTX-M) из 4 изучаемых генов β -лактамаз и их сочетания статистически значимо чаще обнаруживали у штаммов *E. coli* группы D. Микробиота кишечника детей является важным резервуаром штаммов *E. coli*, обладающих резистентностью (в т. ч. множественной) к АМП различных классов. Наличие генов β -лактамаз и полирезистентность наиболее свойственны штаммам *E. coli* филогенетической группы D.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бета-лактамазы, *E. coli*, филогенетические группы, микробиота кишечника

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-73>

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* OF DIFFERENT PHYLOGENETIC GROUPS

L.V. Suzhaeva, S.A. Egorova, M.A. Makarova

Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Escherichia coli is an obligate representative of the human intestinal microbiota, characterized by a wide intraspecific diversity, which is also reflected in the sensitivity to antimicrobial drugs. The species is represented by four main phylogenetic groups (A, B1, B2, D). 511 *E. coli* strains isolated from the intestinal microbiota of children aged 1 month to 17 years were studied. The susceptibility to 15 antibiotics was determined by the disco-diffusion method. The phylogenetic group of strains was determined in triplex PCR using the O. Clermont method. Genes encoding β -lactamases of the molecular classes TEM, SHV, OXA, and CTX-M were detected by multiplex PCR.

The proportion of strains resistant to one or more antimicrobial classes among *E. coli* of phylogenetic group A was 26,9%, B1 — 18,9%, B2 — 42,4%, D — 56,2% ($p < 0.001$). The proportion of multidrug resistant isolates (resistant to 3 or more classes) was 10,2% in group A; 5,4% in

group B1; 14,7% in group B2 and 29,9% in group D ($p < 0.001$). Three (TEM, SHV, STX-M) of the 4 studied β -lactamase genes and their combinations were statistically significantly more often detected in *E. coli* strains of group D. Conclusions. The intestinal microbiota of children is an important reservoir of *E. coli* resistant (including multidrug resistance) to various classes of antibiotics. The presence of β -lactamase genes and multidrug resistance are most characteristic of *E. coli* strains of phylogenetic group D.

Key words: antibiotic resistance, beta-lactamases, *E. coli*, phylogenetic groups, intestinal microbiota

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-74>

Введение. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала перечень приоритетных патогенных микроорганизмов, для борьбы с лекарственной устойчивостью которых необходима разработка новых фармакологических препаратов. Одну из первых позиций в этом перечне занимают резистентные к цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС) и карбапенемостойчивые *Escherichia coli* [1]. На сегодняшний день из 32 новых препаратов, находящихся в стадии разработки, только два активны против этих грамотрицательных бактерий, поэтому детальное изучение формирования и распространения резистентности *E. coli* остаётся актуальной задачей [2].

Больничная среда традиционно рассматривается как источник антибиотикорезистентных микроорганизмов. Однако исследования последних лет свидетельствуют, что резистентность существовала задолго до того, как АМП стали применять в клинической практике, и устойчивостью к антибиотикам обладают не только патогенные микроорганизмы. Микробиом кишечника является важным резервуаром детерминант резистентности [3] и имеет благоприятные условия для их передачи путём горизонтального переноса, в том числе и патогенным микроорганизмам [4].

Escherichia coli — облигатный представитель микробиоты кишечника человека. Вид *Escherichia coli* представлен семью филогенетическими группами, четыре из которых являются основными (A, B1, B2, D). Штаммы основных филогенетических групп отличаются по размеру генома, частоте выявления в различных экологических нишах, способности вызывать заболевания, частоте выявления у жителей различных регионов мира, скоростью роста и способностью образовывать биоплёнки [5]. В контексте изучения антибиотикорезистентности интерес представляет чувствительность штаммов различных филогенетических групп к антимикробным препаратам (АМП).

Цель исследования. Сравнить чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *E. coli* различных филогенетических групп, выделенных из микробиоты кишечника детей, проживающих в Санкт-Петербурге.

Материалы и методы. Исследовано 511 штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей в возрасте от 1 месяца до 17 лет, проживающих в Санкт-Петербурге.

Диско-диффузионным методом (ДДМ) с использованием среды Мюллера-Хинтон и дисков производства Oxoid (Великобритания), согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версии 2014, 2015 гг., определили чувствительность к 15 АМП (ампициллин, цефтазидим, цефотаксим, цефепим, меропенем, налидиксовая кислота, цiproфлоксацин, гентамицин, тобрамицин, амикацин, нитрофурантоин, тетрациклин, хлорамфеникол, фосфомицин, триметоприм/сульфаметоксазол), относящимся к восьми классам АМП.

Детекция генов, определяющих принадлежность *E. coli* к филогенетической группе, проводили в триплекс-ПЦР с электрофоретической детекцией по методу O. Clermont.

Выявление генов устойчивости к бета-лактамам проводили методом мультиплексной ПЦР с электрофоретической детекцией со специфическими праймерами к генам бета-лактамаз молекулярных классов TEM, SHV, OXA и CTX-M.

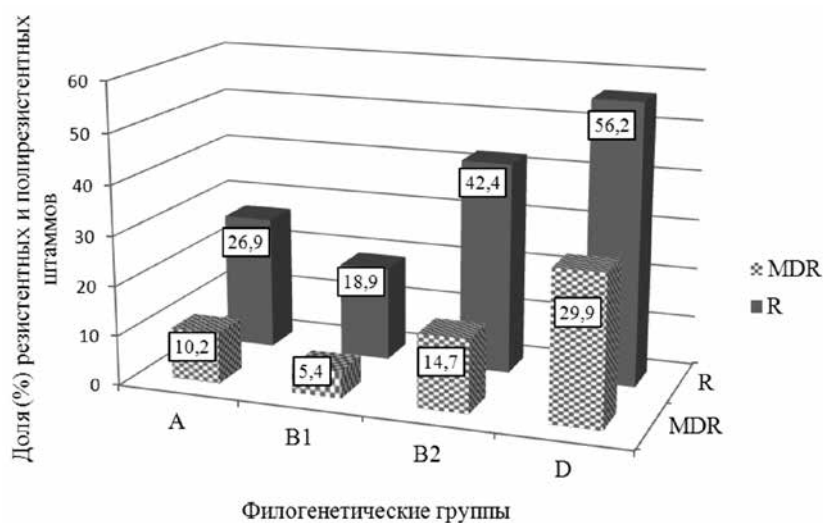
Достигнутый уровень значимости различий определяли с использованием критерия сопряженности χ^2 Пирсона. 95% доверительные интервалы долей и частот рассчитывали методом Уилсона.

Результаты. В исследуемой популяции *E. coli* были представлены штаммы четырёх основных филогенетических групп. Доля изолятов группы A составляла 32,7% (95% ДИ: 28,8–36,9); группы B1 — 7,2% (95% ДИ: 5,3–9,8); группы B2 — 33,3% (95% ДИ: 29,3–37,5); группы D — 26,8% (95% ДИ: 23,2–30,8).

Ко всем исследованным АМП были чувствительны 60,7% (95% ДИ: 56,4–64,8) изолятов, 39,3% (95% ДИ: 35,2–43,6) характеризовались устойчивостью к одному и более классам АМП. Доля штаммов, резистентных к одному или двум классам препаратов, составляла 22,7% (95% ДИ: 19,3–26,5). Полирезистентные (устойчивые к трём и более группам АМП) штаммы составляли 16,6% (95% ДИ: 13,7–20,1).

Доли резистентных штаммов в исследуемой популяции значительно варьировали в зависимости от принадлежности изолятов к той или иной филогенетической группе ($\chi^2 = 34,191$; $df = 3$; $p < 0,001$). Так, наибольшая доля устойчивых штаммов обнаружена в группе D (56,2%), наименьшая — в группе B1 (18,9%) (рисунок).

Доли полирезистентных штаммов также статистически значимо отличались среди *E. coli* различных филогенетических групп ($\chi^2 = 26,294$; $df = 3$; $p < 0,001$). Такие штаммы чаще присутствовали среди представителей филогенетической группы D (29,9%), тогда как в группе B1 составляли лишь 5,4% (рисунок).



Доля резистентных (R) и полирезистентных (MDR) штаммов среди *E. coli* различных филогенетических групп.

Показатели устойчивости к АМП различных классов варьировали. Наибольшие доли резистентных штаммов отмечены для ампициллина и тетрациклина и составляли 29,5% и 20,0% соответственно, наименьшие — у нитрофуранов и аминогликозидов (0,8% и 2,5% соответственно). Резистентность ко всем остальным классам АМП находилась в пределах от 9,8 до 13,3%. Штаммов, нечувствительных к карбопенемам и фосфомицину, не выявили.

Отличия долей резистентных штаммов среди представителей различных филогенетических групп имели высокий уровень значимости (от $p < 0,001$ до $p = 0,002$) для шести (ампициллин, ЦРС, тетрациклин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол, аминогликозиды) из восьми классов препаратов. Чаще всего резистентностью к указанным группам АМП характеризовались штаммы группы D, где доля резистентных штаммов варьировала от 8,0 до 46,7%. Наименьшей устойчивостью обладали штаммы группы B1, где доля резистентных штаммов варьировала от 0 до 10,8%. Резистентность к хинолонам и нитрофурантоину не имела статистически значимых отличий среди штаммов разных филогенетических групп.

При исследовании 94 штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину, но чувствительных к ЦРС, у 81,9% изолятов были выявлены *bla*-гены, кодирующие β -лактамазы молекулярного класса TEM, у 7,4% — молекулярного класса OXA, у 1,0% — молекулярного класса SHV. Причём у 3,2% штаммов одновременно выявлены гены двух классов (TEM + OXA). У 12,9% штаммов гены известных β -лактамаз выявить не удалось.

При изучении 57 штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину и ЦРС, у 50 штаммов (87,7%) обнаружены *bla*-гены, кодирующие продукцию БЛРС молекулярного семейства СТХ-М молекулярных групп СТХ-М1 и СТХ-М9, из них 22,8% штаммов продуцировали только СТХ-М, а остальные 64,9% штаммов сочетали продукцию СТХ-М с другими β -лактамазами (ТЕМ, SHV, ОХА).

Анализ частоты встречаемости генов различных β -лактамаз (широкого и расширенного спектра) у штаммов *E. coli* разных филогенетических групп показал, что эшерихии, независимо от группы, наиболее часто продуцируют β -лактамазы молекулярного семейства ТЕМ (22,7%). Однако штаммы группы D продуцируют их значительно чаще, чем представители остальных групп ($\chi^2 = 29,279$; $df = 3$; $p < 0,001$). Распространённость *bla*-генов ТЕМ в этой группе составила 37,2%. Наименьшая распространённость этих генов отмечалась в группе В1 — 10,8% (таблица).

Гены β -лактамаз молекулярных классов СТХ-М и SHV, а также различные сочетания исследуемых генов резистентности чаще обнаруживались среди *E. coli* филогенетической группы D. Распространённость генов β -лактамаз молекулярного класса ОХА статистически значимо не отличалась среди *E. coli* различных филогенетических групп ($\chi^2 = 4,522$; $df = 3$; $p = 0,210$) (таблица).

Выводы. При изучении чувствительности к АМП штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, установлено, что 39,3% штаммов резистентны к одному и более классам АМП, причем 16,6% имеют множественную устойчивость к трём и более классам. Устойчивость к бета-лактам

Доля штаммов, содержащих гены β -лактамаз, среди *E. coli* основных филогенетических групп

Молекулярный класс генов β -лактамаз	Доля резистентных штаммов различных филогенетических групп (%)				Значение критерия χ^2 ($df = 3$)	Уровень значимости (p)
	A (N = 167)	B1 (N = 37)	B2 (N = 170)	D (N = 137)		
ТЕМ	12,6	10,8	23,5	37,2	29,279	<0,001
ОХА	0,6	2,7	2,9	4,4	4,522	0,210
SHV	1,8	0	0,6	8,0	17,642	0,001
СТХ-М	6,0	0	10,0	16,8	14,362	0,002
Сочетания генов	4,8	2,7	7,6	15,3	13,040	0,005

мам (препаратам, наиболее часто используемым в педиатрической практике) выявлена у 29,5% штаммов, включая 11,2% устойчивых к ЦРС. Резистентность к бета-лактамам была обусловлена продукцией бета-лактамаз: к ампициллину — молекулярного семейства TEM (81,9%), к ЦРС — молекулярного семейства CTX-M (87,7%) групп CTX-M 1 (66%) и CTX-M 9 (34%).

Анализ полученных в ходе исследования данных показал наличие статистически значимых отличий в устойчивости штаммов *E. coli* различных филогенетических групп к антимикробным препаратам. Большие доли резистентных и полирезистентных штаммов выявлены в филогенетической группе D, наименьшие — в группе B1. Гены β -лактамаз широкого и расширенного спектра также наиболее часто присутствовали в геномах штаммов филогенетической группы D.

Исследование показало, что микробиота кишечника детей является важным резервуаром штаммов *E. coli*, обладающих резистентностью (в т. ч. множественной) к АМП различных классов. Устойчивые к АМП аутоштаммы *E. coli* могут быть причиной инфекций у ослабленных детей и пациентов отделений интенсивной терапии, а также могут передавать гены резистентности патогенным микроорганизмам. Дальнейшее детальное изучение резистентности *E. coli*, присутствующих в микробиоте кишечника, будет способствовать расширению наших знаний о механизмах её формирования, путях распространения и возможных способах её устранения.

Литература

1. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017. 88 p. https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf «Accessed September 09, 2020»
2. Antibacterial agents in preclinical development: an open access database. Geneva: World Health Organization; 2019. 20 p. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330290/WHO-EMP-IAU-2019.12-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> «Accessed September 09, 2020»
3. Sommer M., Dantas G., Church G.M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science (New York, N.Y.)*. 2009. Vol. 325. P. 1128–1131. DOI: 10.1126/science.1176950
4. Lerner A., Matthias T., Aminov R. Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut. *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. P. 1630. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01630
5. Nielsen D., Klimavicz J., Cavender T., Wannemuehler Y., Barbieri N. et al. The impact of media, phylogenetic classification, and *E. coli* pathotypes on biofilm formation in extraintestinal and commensal *E. coli* from humans and animals. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 902. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00902.



МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫЕ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫЗВАВШИЕ ТЯЖЁЛЫЕ ФОРМЫ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ В ОТДЕЛЕНИИ НЕЙРОРЕАНИМАЦИИ

Н.К. Фурсова¹, Е.И. Асташкин¹, Т.С. Новикова¹, Г.Н. Федюкина¹, О.Н. Ершова²

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk;

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; MDR; XDR; сиквенс-тип; гены антибиотикорезистентности; гены вирулентности

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-79>

MULTIDRUG-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CAUSED SEVERE INFECTIONS IN THE NEURO-ICU

N.K. Fursova¹, E.I. Astashkin¹, T.S. Novikova¹, G.N. Fedyukina¹, O.N. Ershova²

¹State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russia;

²National Medical Research Center of Neurosurgery named after academician N.N. Burdenko, Moscow, Russia

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, MDR, XDR, sequence type, antibiotic resistance genes, virulence genes

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-79>

Введение. *Klebsiella pneumoniae* — один из основных возбудителей инфекционных осложнений у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ).

Цель исследования. Характеристика 42 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от 19 пациентов ОРИТ Москвы в 2017–2019 гг.

Материалы и методы. Идентифицировали бактерии на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия); чувствительность к 26 антибиотикам 9 функциональных классов определяли на Vitek 2 (BioMerieux, Франция). MLST-типирование, детекцию генов резистентности (бета-лактамаз TEM, SHV, CTX-M, OXA-48, NDM, VIM, KPC и интегров классов 1 и 2) и вирулентности (*rmpA*, *iroN*, *iroD*, *uge*, *wabG*, *kfu*, *fimH*, *allS* и *allR*) осуществляли методом ПЦР.

Результаты. Изучены штаммы, выделенные от пациентов с выраженной системной воспалительной реакцией (группа А, *n* = 18); с системными проявлениями васкулита и нарушением микроциркуляции (группа В, *n* = 11); без выраженных проявлений системных инфекций (группа С, *n* = 13). По критериям Magioracos, штаммы *K. pneumoniae* отнесены к категориям резистент-

ных, R ($n = 5$), множественно резистентных, MDR ($n = 1$) и экстремально резистентных, XDR ($n = 36$). Идентифицированы 12 сиквенс-типов (ST), в том числе новый ST3492. Сиквенс-типы ST14, ST39, ST219, ST268 и ST2674 были ассоциированы с группой А; ST76 и ST3492 — с группой В; ST147 — с группой С; ST23, ST307 и ST395 — с разными группами. В штаммах идентифицированы гены *blaSHV* ($n = 42$), *blaCTX-M* ($n = 31$), *blaTEM* ($n = 22$), *blaOXA-48* ($n = 22$), *blaNDM* ($n = 1$), *int1* ($n = 12$) и *int2* ($n = 2$). Выявлены 8 сочетаний генов вирулентности, содержащих от 3 до 8 генов: набор (*uge*, *wabG*, *fimH*, *allS*) определён у штаммов групп А, В и С; наборы (*wabG*, *fimH*, *allS*), (*uge*, *wabG*, *kfu*, *fimH*, *allS*) и (*rmpA*, *iroN*, *iroD*, *uge*, *wabG*, *fimH*, *allS*) — у штаммов группы А; наборы (*rmpA*, *iroN*, *iroD*, *wabG*, *fimH*, *allS*) и (*rmpA*, *uge*, *wabG*, *fimH*, *allS*) — у штаммов группы В; набор (*rmpA*, *wabG*, *fimH*, *allS*) — у штаммов группы С.

Выводы. Для *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов ОРИТ, характерны высокий уровень антибиотикорезистентности и значительное генетическое разнообразие, отражающие активные эволюционные процессы у данного патогена и подтверждённые идентификацией нового сиквенс-типа. Отмечена корреляция между сиквенс-типами, наборами генов вирулентности и тяжестью септических и геморрагических проявлений инфекционного процесса.

Исследование выполнено в рамках гранта Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31.10.2019 г.).



ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РИККЕТСИОЗОВ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ТИПИЧНЫМИ И АТИПИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ

Т.А. Чеканова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В группе пациентов с типичными клиническими признаками острого клещевого риккетсиоза специфические IgM и/или IgG в сочетании/без антител класса А выявлены в 75,6% случаев. IgG в большинстве случаев были низкоавидными, что свидетельствовало в пользу недавнего первичного инфицирования. Более чем в 20% сывороток обнаружены одиночные группоспецифические IgA. У пациентов с атипичным течением риккетсиоза преобладали высокоавидные IgG наряду с наличием специфических IgM и/или IgA, что может свидетельствовать о реинфекции или об инфицировании другим, отличным от первичного этиологического источника, патогенным видом риккетсий из группы КПЛ.

Ключевые слова: риккетсиозы, группа клещевой пятнистой лихорадки, серологическая диагностика

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-81>

LABORATORY CONFIRMATION OF THE SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIOSES AMONG PATIENTS WITH TYPICAL AND ATYPICAL CLINICAL MANIFESTATIONS

Chekanova T.A.

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

In the group of patients with typical clinical signs of acute tick-borne rickettsioses, specific IgM and/or IgG with/without IgA were found in 75.6% cases. IgG were low avidity in most cases, which indicated the recent primary infection. More than 20% of sera have single group specific IgA. In patients with atypical manifestations highly avidity IgG were predominant, that along with the presence of IgM and/or IgA may indicate re-infection or infection by new species, which is different from previous pathogen of the tick-borne spotted group rickettsioses.

Key words: rickettsioses, spotted fever group, serological diagnostics

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-81>

Введение. Группа риккетсиозов клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), широко распространённая во всем мире, является самой представительной из рода *Rickettsia*, включающая на сегодняшний день как минимум 24 вида, из которых не менее 18 видов патогенны для человека. Триада клинических симптомов — лихорадка, первичный аффе́кт после присасывания клеща,

сыпь — является практически неоспоримым основанием для постановки первичного диагноза, дополнительно подкрепляемым фактом заболевания в высокий сезон активности переносчиков, чаще иксодовых клещей, и пребыванием пациентов в эндемичных регионах. Лабораторное подтверждение острого клещевого риккетсиоза базируется либо на выявлении возбудителя из биоптатов/смывов с первичных аффектов, реже — из крови/её компонентов при условии высокого содержания в ней риккетсий и достаточной чувствительности наборов реагентов для ПЦР, либо на обнаружении специфических антител. Однако серологическая диагностика носит группоспецифический характер, а первичный аффект может оставаться незамеченным или вовсе не развиваться, например, при контактном инфицировании, возникающем вследствие раздавливания клещей/нимф. Атипичные клинические проявления усугубляют проблему верификации диагноза. Описаны случаи риккетсиозов группы КПЛ (средиземноморская пятнистая лихорадка, лихорадка Скалистых Гор, астраханская пятнистая лихорадка) с отсутствием сыпи или очень скудными единичными высыпаниями [1–3]. Вместе с тем до трети случаев острого клещевого риккетсиоза с типичными клиническими признаками не удаётся в период госпитализации пациента подтвердить лабораторно. Таким образом, необходимость совершенствования методов диагностики риккетсиозов группы КПЛ не вызывает сомнения.

Цель исследования. Анализ особенностей лабораторного подтверждения острых риккетсиозов группы КПЛ с типичными и атипичными клиническими проявлениями.

Материалы и методы. В исследование включены 2 группы лихорадящих пациентов, отмечавших ранее присасывание клещей или контакт с ними. Первая группа включала 86 пациентов с типичными клиническими признаками острого риккетсиоза (первичный аффект, характерная сыпь и лихорадка). Вторая группа из 20 лихорадящих пациентов отличалась от первой тем, что за весь период наблюдения не было выявлено сыпи (или отмечались одиночные редкие элементы), при этом присутствовали другие клинические симптомы, характерные для аденовирусной инфекции и/или острого респираторного заболевания (чаще конъюнктивит, гиперемия зева, боль в горле и др.).

В работе были использованы наборы реагентов для иммуноферментного анализа: экспериментальный набор для дифференциального выявления антител классов А, М, G к антигенам риккетсий группы КПЛ (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), выполненный в соответствии с описанием к патенту [4], и «Rickettsia conorii ELISA IgG/IgM» (Vircell, Испания). В образцах с наличием специфических IgG дополнительно исследовали индекс avidности данных антител с применением вышеуказанного экспериментального набора с модификацией проведения

анализа согласно ранее отработанной методике, хорошо зарекомендовавшей себя в диагностике риккетсиозов другой группы — группы сыпного тифа [5].

Избирательно исследовали смывы с первичных аффектов и лейкоцитарную фракцию крови методом ПЦР для выявления ДНК возбудителя с применением наборов реагентов «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» (ЗАО «Вектор-Бест»), «АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-FL» (ЦНИИЭ).

Результаты и обсуждение. В группе пациентов с типичными клиническими признаками острого клещевого риккетсиоза (предполагаемые диагнозы — астраханская пятнистая лихорадка, клещевой сыпной тиф Северной Азии, дальневосточный риккетсиоз) ДНК риккетсий была выявлена в крови 7 пациентов из 67 исследованных и в 13 образцах смывов с первичного аффекта из 19. Специфические IgM и/или IgG в сочетании или без антител класса А выявлены в 65 сыворотках (75,6%). В сыворотках 19 пациентов были определены одиночные группоспецифические антитела класса А (титры — 1: 10–1: 160). Антитела класса G, содержащиеся в сыворотках крови 38 пациентов (в сочетании/без антител классов М и А), в большинстве случаев ($n = 29$) были низкоавидными (индекс авидности < 50%), 3 образца показали переходную авидность (индекс авидности — 64%, 58,8% и 62,5%), что свидетельствовало в пользу недавнего первичного инфицирования.

В группе из 20 пациентов с атипичными клиническими проявлениями у 2 была обнаружена ДНК *Rickettsia species* в образцах смывов с первичных аффектов. У 19 пациентов выявлены специфические антитела класса G двумя ИФА-наборами, при этом в сочетании с IgM — в пяти сыворотках крови, в сочетании с IgM и IgA — в двух образцах. Не было выявлено образцов с одиночными IgM. У одного пациента с подтверждённым методом ПЦР клиническим диагнозом «астраханская пятнистая лихорадка» были обнаружены в сыворотке крови только одиночные антитела класса А. Следует отметить, что индекс авидности IgG у 11 пациентов из 19 превышал 70%, что исключало недавнее инфицирование, при этом дополнительное обнаружение специфических антител классов М и/или А может свидетельствовать в пользу повторного заражения или инфицирования другим патогенным для человека видом риккетсий из группы КПЛ, отличным от этиологического источника, вызвавшего заболевание ранее.

Выводы. Необходимо дальнейшее исследование причин атипичного клинического течения риккетсиозов группы КПЛ. Несмотря на то что случаи повторного инфицирования при риккетсиозах группы КПЛ не описаны, полученные данные при исследовании некоторых сывороток крови не исключают такую возможность.

Благодарности. Автор благодарит коллектив лаборатории экологии риккетсий НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, на базе которой частично была выполнена данная работа.

Литература

1. Stewart A. et al. The epidemiology and clinical features of rickettsial diseases in North Queensland, Australia: Implication for patients identification and management. *PLOS Negl. Trop. Dis*, 2019, 13, e0007583.
2. Biggs H. et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, Anaplasmosis — United States. *MNWR Recomm Rep*. 2016; 65(No RR-2). P. 1–44
3. Шерышева Ю.В. Клинико-диагностическая значимость индукторов эндогенного интерферона при лечении больных астраханской риккетсиозной лихорадкой. Диссертация на соискание ученой степени к.м.н., Москва, 2007 г.
4. Чеканова Т.А., Костарной А.В., Кондратьев А.В., Гинцбург А.Л. Способ серологической диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки, иммуноферментная диагностическая тест-система для его осуществления. Патент RU 2726484 C1, заявка 2019113159 от 29.04.2019 г.
5. Чеканова Т.А., Шпынов С.Н., Тарасевич И.В. Авидность специфических IgG к *Rickettsia prowazekii* как дополнительный критерий серологической дифференциальной диагностики эпидемического сыпного тифа и его рецидивирующей формы — болезни Брилла–Цинссера. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2018, № 5, с. 73–80, DOI: 10.36233/0372-9311-2018-5-73-80.



ЗНАЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК ЦМВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИИ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

В.И. Шахгильдян¹, М.С. Ядрихинская², А.А. Орловский³, О.Ю. Шипулина¹,
Э.А. Домонова¹, Е.Б. Яровая³

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²Московский городской центр по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва;

³ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

Согласно результатам обследования 5485 госпитализированных больных ВИЧ-инфекцией (на стадии СПИДа 3333 пациентов), определена частота клинически выраженной ЦМВ-инфекции, частота и характер ЦМВ поражения лёгких. Установлена статистически значимая связь между вирусной нагрузкой и репликативной активностью ЦМВ, риском развития ЦМВ-пневмонии. Установлена статистически значимая связь между количеством CD4-лимфоцитов в крови и количественным содержанием ДНК ЦМВ в крови, лаважной жидкости, биоптатах бронхов, мокроте, а также с частотой развития ЦМВ-пневмонии. Показаны высокая диагностическая чувствительность, но низкая специфичность качественного определения ДНК ЦМВ в крови и респираторных биоматериалах в отношении ЦМВ-пневмонии. Определены концентрации ДНК ЦМВ клетках крови, плазме крови, БАЛЖ, биоптатах бронхов, мокроте, с 95% и 99% вероятностью подтверждающие наличие ЦМВ-пневмонии, а также с 90% и 99% вероятностью исключающие ЦМВ природу поражения лёгких у больных ВИЧ-инфекцией.

Ключевые слова: количество ДНК ЦМВ, ЦМВ-пневмония, ВИЧ-инфекция

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-85>

CYTOMEGALOVIRUS DNA CONCENTRATION IN BIOLOGICAL SAMPLES AS A KEY TO THE DIAGNOSIS OF CMV PNEUMONIA IN HIV-INFECTED PATIENTS

V.I. Shakhgildyan¹, M.S. Yadrikhinskaya², A.A. Orlovsky, O.Y. Shipulina¹,
E.A. Domonova¹, E.B. Yarovaya⁴

¹Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia;

²Moscow City Centre for AIDS Prevention and Treatment, Moscow, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

According to examination and follow-up results of 5485 HIV-positive hospitalized patients (3333 of which were diagnosed with AIDS) we have identified the frequency of clinically evident CMV-infection as well as the frequency and character of CMV related lung disease. Statistically significant correlation between viral load, degree of immunosuppression, CMV replication rate and CMV pneumonia development risk has been determined. Qualitative PCR assay for CMV DNA in plasma and respiratory samples was found to have high sensitivity and low specificity

for diagnosing CMV-pneumonia. We identified quantitative PCR CMV DNA values in blood cells, plasma, bronchoalveolar lavage, bronchi samples and sputum that confirm the diagnosis of CMV pneumonia with 95% and 99% probability, and exclude CMV related lung damage in HIV patients with 90% and 99% probability.

Key words: quantitative CMV DNA, CMV-pneumonia, HIV-infection

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-86>

Введение. Согласно данным персонафицированного учета СНИЛ ЭП СПИД, за период с 1987 по 2019 г. в России на 30.04.2020 г. зарегистрировано 1 453 000 случаев ВИЧ-инфекции. Умерли 355 160 человек, из них в 2019 г. — 33 577. Более 80% больных на стадии СПИДа погибли. По данным патолого-анатомического отделения ИКБ №2 ДЗМ, за последние 10 лет 83% умерших пациентов с ВИЧ-инфекцией имели поражение органов дыхания [1]. У больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекцией цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) — одна из наиболее распространённых и тяжёлых болезней, в большинстве случаев протекающая с поражением лёгких [2–4]. Диагноз ЦМВ-пневмонии требует обязательного лабораторного подтверждения. Согласно нашим предыдущим исследованиям, серологические маркёры (количество антител класса IgG, наличие IgM в крови, авидность IgG) имеют низкое значение для подтверждения манифестной ЦМВИ у больных ВИЧ-инфекцией [5]. С другой стороны, чёткое врачебное представление о диагностическом значении (клинических чувствительности и специфичности) наличия ДНК ЦМВ в том или ином биологическом материале отсутствует, клиническая роль количественного содержания ДНК ЦМВ в мокроте, бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ), биоптатах бронхов, плевральной жидкости для подтверждения ЦМВ-этиологии лёгочной патологии неизвестна.

Цель работы заключалась в установлении значения различных концентраций ДНК ЦМВ в крови и респираторных биоматериалах для подтверждения ЦМВ-этиологии пневмонии у больных ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы. В 2012–2015 гг. проводили клиническое наблюдение и анализировали истории болезни 5485 больных ВИЧ-инфекцией, находившихся в ИКБ №2 ДЗМ. У 87% лиц возраст составлял 25–45 лет. Большинство пациентов (50,1%) имели стадии 4Б (СПИД), 4В (СПИД), высокую (>100 000 копий/мл) концентрацию РНК ВИЧ в крови (77,3%) и выраженный иммунодефицит (количество CD4-лимфоцитов < 350 кл/мкл) (77% случаев). Лёгочную патологию диагностировали у 1954 пациентов. АРТ получали лишь 17% пациентов. Умерли 593 человека (10,8% случаев).

Для этиологической расшифровки лёгочных поражений осуществляли КТ ОГК, бронхоскопию, плевральную пункцию с исследованием образцов БАЛЖ,

биоптатов бронхов, плевральной жидкости, мокроты и образцов крови (клеток крови и плазмы) на количественное определение ДНК возбудителей вторичных заболеваний, в том числе ДНК ЦМВ (ПЦР наборы реагентов производства ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора). Секционные исследования осуществляли в патологоанатомическом отделении ИКБ №2 ДЗМ.

Критериями постановки диагноза ЦМВ-пневмонии служили: патоморфологическое подтверждение ЦМВ-поражения лёгких и/или комплекс клинико-рентгенологических признаков: клиническая картина болезни, у части больных в сочетании с ретинитом, язвенным эзофагитом или колитом, энцефаловентрикулитом; относительно характерная рентгенографическая картина поражения лёгких; отсутствие ДНК МБТ, отсутствие или незначительное количество ДНК других возбудителей в материалах респираторного тракта, неэффективность антибактериальной и противогрибковой терапии.

Для статистической обработки результатов использовали пакеты статистических программ Statistica v. 10.0 и SPSS v. 20, а также язык программирования R. Количественные показатели в силу их отклонения от нормального распределения разбивались на группы по клинически значимым отрезным точкам, для исследования их взаимосвязей применялся анализ таблиц сопряжённости с применением критерия χ^2 Пирсона. Поиск ассоциаций количества копий ДНК ЦМВ в биоматериалах с наличием ЦМВ-пневмонии проводили с применением ROC-анализа и определением диагностических чувствительности и специфичности для различных отрезных точек по количеству ДНК ЦМВ. Уровень значимости для проверяемых статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты. Из 3333 пациентов на стадиях 4Б (СПИД), 4В (СПИД) манифестная ЦМВИ имела место у 453 (13,6%) больных. Поражение лёгких ЦМВ-этиологии диагностировано у 343 пациентов: 75,5% среди больных ЦМВИ, 10,3% от числа больных на стадии СПИДа, 17,6% у лиц с лёгочной патологией. ЦМВ был единственной причиной поражения лёгких в 188 (54,8%) случаев. Умерло 85 (25%) больных ЦМВ-пневмонией.

Установлены статистически значимые связи между вирусной нагрузкой, уровнем CD4-лимфоцитов и количеством ДНК ЦМВ в клетках крови, плазме, БАЛЖ, частотой развития ЦМВ-пневмонии (критерий χ^2 Пирсона, $p < 0,0001$).

Из 743 исследуемых образцов крови ДНК ЦМВ в клетках крови была обнаружена в 52,8% случаях (393 больных). ЦМВ-пневмония имела место у 133 (33,8%) пациентов с наличием ДНК ЦМВ в клетках крови и лишь у 8 (2,3%) при отсутствии вируса (350 образцов). Содержание ДНК ЦМВ в клетках крови составляло от 0,5 до 5,6 lg в 10^5 лейкоцитах (медиана 1,8, интерквартильный размах [1,2–2,5] lg в 10^5 лейкоцитах). Согласно выбранным группам, из 743 пациентов количество ДНК вируса $<1,0$ lg в 10^5 лейкоцитах зафиксировано

у 2,6% (19), 1,0–2,0 lg — в 28% (212), 2,1–2,9 lg — 13% (94), $\geq 3,0$ lg в 10^5 лейкоцитах — 9,2% (68) больных. При использовании ROC-анализа в отношении ЦМВ-пневмонии установлено, что для отрезного значения ДНК ЦМВ в клетках крови, равного 3,95 lg копий в 10^5 лейкоцитов, специфичность (при указанной чувствительности) составила 99% (13%), для значения 2,95 lg копий в 10^5 лейкоцитах — 95% (41%) соответственно. Для низкой отрезной точки, равной 1,15 lg копий в 10^5 лейкоцитах, чувствительность (при указанной специфичности) составила 90% (32%), равной $<1,0$ lg копий в 10^5 лейкоцитах — 99% (7%) соответственно.

Из 3623 образцов плазмы ДНК ЦМВ обнаружена у 623 (17,2%) больных. ЦМВ-пневмония диагностирована у 175 (28,1%) пациентов с наличием ДНК ЦМВ в плазме и 49 (1,6%) при отсутствии вируса в крови (3000 образцов). Концентрация ДНК ЦМВ в плазме находилась в пределах от 100 до 10000000 копий/мл (медиана 910, интерквартильный размах [165–4350] копий/мл). В результате применения ROC-анализа выделены: отрезное значение 90000 копий/мл в плазме крови со специфичностью (при указанной чувствительности) 99% (9%), отрезное значение 9000 копий/мл — со специфичностью (при указанной чувствительности) 94% (47%) соответственно. Для отрезной точки 400 копий/мл чувствительность (при указанной специфичности) составила 90% (46%), при 200 копий/мл — 94% (33%) соответственно.

ДНК ЦМВ в БАЛЖ была обнаружена у 873 (56,8%) из 1536 пациентов. Среди 873 больных с наличием ДНК ЦМВ в БАЛЖ ЦМВ-пневмония диагностирована у 197 (22,6%). При отсутствии ДНК ЦМВ в БАЛЖ (663 больных) — лишь в 7 (1,1%) случаев. Содержание ДНК ЦМВ в БАЛЖ было от 100 до 79900700 копий/мл (медиана 1100, интерквартильный размах [300–10980] копий/мл). При ROC-анализе в отношении ЦМВ-пневмонии для отрезного значения ДНК ЦМВ, равного 63000 копий/мл, специфичность (при указанной чувствительности) составила 99% (54%), 25000 копий/мл — 95% (63%). Для низкой отрезной точки, соответствующей 1000 копий/мл, чувствительность (при указанной специфичности) была равна 91% (60%).

ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов выявлена в 60 (24,8%) из 242 образцов. Среди 182 больных с наличием ДНК ЦМВ в материале ЦМВ-пневмония диагностирована у 18 (30%), среди не имевших ДНК ЦМВ в биоптатах — лишь в 5 (2,7%) случаев. Количество ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов составило от 100 до 5203226 копий в 10^5 клетках (медиана 460, интерквартильный размах [200–2198] копий в 10^5 клетках). При ROC-анализе для количества 10000 копий в 10^5 клетках диагностическая специфичность составила 100% (чувствительность 50%), 3500 копий в 10^5 клетках — 95% и 56% соответственно. Для значения 200 копий в 10^5 клетках чувствительность была 89% при специфичность 29%.

ДНК ЦМВ в мокроте выявлена в 30 (66,7%) из 45 образцов. Среди больных с наличием ДНК ЦМВ в мокроте у 6 (20%) поставлен диагноз ЦМВ-пневмонии. Случаев ЦМВ-пневмонии при отсутствии ДНК ЦМВ в мокроте не было. Концентрация ДНК ЦМВ находилась в пределах: от 100 до 1314600 копий/мл (медиана 1800, интерквартильный размах [300–6900] копий/мл). При ROC-анализе установлено: при концентрации 45000 копий/мл диагностическая специфичность составила 100% (чувствительность 50%), 20000 копий/мл — 96% и 50% соответственно; при концентрации ДНК ЦМВ, равной 3500 копий/мл, чувствительность была 100% при специфичности 71%.

ДНК ЦМВ в плевральной жидкости обнаружена у 15 (22,4%) из 67 образцов в количестве от 100 до 17900 копий/мл (медиана 1200, интерквартильный размах [200–7800] копий/мл). Среди больных с наличием ДНК ЦМВ в указанном биоматериале у 2 (13,3%) имела место ЦМВ-пневмония, при отсутствии ДНК ЦМВ ни у одного из 52 больных ЦМВ-пневмония не зафиксирована.

Выводы. 1. У больных ВИЧ-инфекцией установлена статистически значимая связь между показателями вирусной нагрузки, уровнем CD4-лимфоцитов в крови, репликативной активностью ЦМВ и риском развития ЦМВ-пневмонии: частота выявления и вероятность высоких концентраций ДНК ЦМВ в крови, БАЛЖ, биоптатах бронхов, мокроте, плевральной жидкости, вероятность развития ЦМВ-пневмонии увеличиваются у больных с высокой концентрацией РНК ВИЧ в плазме крови и низким количеством CD4-лимфоцитов.

2. Исследование крови, респираторных биоматериалов на наличие ДНК ЦМВ (качественный анализ) имеет высокую чувствительность (отсутствие ДНК вируса в них практически исключает ЦМВ-природу поражения лёгких), но низкую специфичность (факт обнаружения ДНК ЦМВ в биообразцах не подтверждает наличие ЦМВ-пневмонии).

3. Диагностическим значением обладает определённая концентрация ДНК вируса в биоматериале. Выявление ДНК ЦМВ в клетках крови в количестве равном или более $2,95 \lg$ копий в 10^5 лейкоцитах, плазме крови — 9000 копий/мл, БАЛЖ — 25000 копий/мл, биоптатах бронхов — 3500 копий в 10^5 клетках и мокроте — 20000 копий/мл с 95% вероятностью подтверждает цитомегаловирусную природу поражения лёгких, служит основанием для постановки диагноза ЦМВ-пневмонии и проведения курса этиотропной терапии. Выявление ДНК ЦМВ в клетках крови в концентрации $< 1,0 \lg$ копий в 10^5 лейкоцитах, плазме крови — < 200 копий/мл, образцах БАЛЖ — < 200 копий/мл, биоптатах бронхов — < 100 копий, мокроте — < 3500 копий/мл практически исключает наличие ЦМВ-пневмонии и требует продолжения диагностического поиска для установления природы лёгочной патологии.

Литература

1. Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Орловский А.А., Яровая Е.Б. Клиническая, вирусологическая, иммунологическая характеристика госпитализированных больных ВИЧ-инфекцией. *Тер. архив*: 2018. Т.90, №11. С. 18–23.
2. Беляков Н.А., Рассохин В.В. Коморбидные состояния при ВИЧ-инфекции. Часть 1. Основы проблемы. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2018. 184 с.
3. Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Сафонова А.П., Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Альварес Фигероа М.В., Долгова Е.А., Тишкевич О.А. Структура вторичных заболеваний и современные подходы к их лабораторной диагностике у больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидем. и инф. бол. Акт. вопр.* 2015. №1. С. 24–30.
4. Васильева Т.Е., Литвинова Н.Г., Шахгильдян В.И., Ольшанский А.Я., Филиппов П.Г., Морозова С.В., Кравченко А.В., Груздева Б.М., Данилова Т.В. Структура легочной патологии и характер вентиляционных нарушений у больных ВИЧ-инфекцией с различной глубиной иммуносупрессии. *Тер. архив*. 2007. Т. 79. №11. С.31–35.
5. Шахгильдян В.И. Цитомегаловирусная инфекция. В кн.: Лекции по инфекционным болезням: в 2 т./Н.Д. Ющук, Ю.Я. Венгеров. 4-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016: Т. 2. 592 с.

ГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЗАВИСИМОСТИ



КОНСТРУИРОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ЧУМНЫХ ВАКЦИН

А.П. Анисимов, М.Е. Платонов, С.В. Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, чумная вакцина

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-91>

CONSTRUCTION OF MODERN PLAGUE VACCINES

A.P. Anisimov, M.E. Platonov, S.V. Dentovskaya

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russia

Key words: *Yersinia pestis*, plague vaccine

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-91>

Возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, — причина гибели более 200 000 000 людей. И в наше время этим особо опасным зоонозом ежегодно заражается несколько тысяч человек. Без лечения смертность достигает 60–100%. С конца прошлого века в природных очагах начали циркулировать штаммы, устойчивые ко всем антибиотикам, рекомендованным экспертами ВОЗ для терапии чумы. Единственная разрешённая к использованию в ряде стран живая чумная вакцина не соответствует требованиям ВОЗ. Всё это свидетельствует об актуальности конструирования современных чумных вакцин.

С учётом того, что аттенуированные штаммы патогенных бактерий сохраняют способность вызывать генерализованную инфекцию с летальным исходом у лиц с нарушениями иммунного статуса или метаболическими заболеваниями, предпочтительной является разработка неживых вакцин. В последние годы основные усилия исследователей были направлены на конструирование субъединичных вакцин на основе двух иммунодоминантных F1 и V антигенов, которые великолепно защищали мышей от заражения штаммами дикого типа, но не защищали мышей от заражения F1-негативными штаммами и/или штам-

мами, продуцирующими атипичные изоформы V антигена, были недостаточно протективными в отношении морских свинок и некоторых видов обезьян.

На рубеже XX и XXI вв. были разработаны две новые технологии конструирования бактериальных вакцин, сочетающие преимущества живых и субъединичных вакцин, но лишённые большинства их недостатков. Это технологии «бактериальных теней» и «везикул внешних мембран», позволяющие получать микро- или наночастицы, образованные бактериальной стенкой с нативными (неденатурированными) антигенами, но не способные размножаться за счёт отсутствия у них хромосомной ДНК. Обе технологии допускают генетические манипуляции со штаммами-продуцентами «бактериальных теней» и «везикул внешних мембран», позволяющие целенаправленно удалять из генома гены иммуносупрессивных и/или токсических биомолекул. В нашей лаборатории мы используем оба этих подхода, уже получены первые положительные результаты, однако их обсуждение не укладывается в рамки 15-минутной презентации.



ПЕРВОЕ ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ХРОМОСОМНО-ИНТЕГРИРОВАННОГО *HUMAN BETAHERPES VIRUS 6B*, ПЕРЕДАВАЕМОГО ПО НАСЛЕДСТВУ, В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Э.А. Домонова¹, К.В. Кулешов¹, И.А. Гоптарь², А.В. Никифорова²,
О.Ю. Сильвейстрова¹, О.Ю. Шипулина¹

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²ФГБНУ «НИИ медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова», Москва

Ключевые слова: *Humanbetaherpesvirus 6B*, вирус герпеса человека 6B, массовое параллельное секвенирование, наследование, хромосомная интеграция

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-93>

FIRST WHOLE GENOME SEQUENCE OF INHERITED CHROMOSOMALLY INTEGRATED *HUMAN BETAHERPES VIRUS 6B* IN RUSSIA

E.A. Domonova¹, K.V. Kuleshov¹, I.A. Goptar², A.V. Nikiforova², O.Y. Silveystrova¹,
O.Y. Shipulina¹

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

Key words: *inherited chromosomally integrated Human betaherpesvirus 6B*, *icHHV-6B*, *next-generation sequencing*, NGS

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-93>

Введение. *Human betaherpes virus 6B* (вирус герпеса человека 6B, ВГЧ-6B) чрезвычайно широко распространён во всём мире. Свыше 90% взрослого населения инфицировано данным вирусом [1]. Показано, что *Human betaherpes virus 6B*, как и *Human betaherpes virus 6A*, способен эффективно интегрировать в субтеломерную/теломерную область хромосом клетки-хозяина как *in vitro*, так и *in vivo*, благодаря особенностям организации генома [2,3]. В результате интеграции формируется хромосомно-интегрированная (хи) форма вируса. Интеграция вируса *in vivo* может привести к наследованию от поколения к поколению с 50% вероятностью. Наследуемые эндогенные хромосомно-интегрированные формы ВГЧ-6A/B выявляются у 0,6–2% населения мира [4].

В 2019 г. мы впервые представили предварительные данные по частоте выявления хиВГЧ-6A/B, передаваемого по наследству, в РФ (на примере города Москвы и Московской области) [5]. В ходе данной работы проведено выявление и лабораторное подтверждение наследственной передачи хиВГЧ-6B в трёх поколениях, что и побудило нас провести более углубленное генетическое изучение одного из выделенных изолятов.

Цель исследования. Провести полногеномное секвенирование эндогенного изолята хиВГЧ-6В (MOW-F5C), выделенного у российского пациента, с последующим первичным анализом полученных данных.

Материалы и методы. Полногеномное секвенирование образца тотальной ДНК, экстрагированной из образца цельной крови мужчины (возраст 21 год) с хиВГЧ-В-статусом, проживающего в Москве, выполняли после предварительного обогащения вирусного генома с использованием панели праймеров, предложенной E. Zhang с соавторами [6]. Условия проведения амплификации и составы реакционных смесей описаны ранее [7]. По окончании амплификации смесь ампликонов чистили с помощью магнитных карбоксилированных частиц и изготавливали библиотеки для секвенирования. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina, США), используя наборы «MiSeq Reagent Kit» v3 (Illumina, США). Полученные прочтения фильтровали по качеству и удаляли последовательности праймеров и адаптеров. Достаточность объёма полученных данных оценивали путем картирования прочтений на референс-геном эталонного экзогенного штамма HST *Human betaherpes virus* 6В. *De novo* сборку проводили с использованием Spades v3.0.15. Коррекцию контигов выполняли с помощью Pilon v1.22. Псевдогеном получали путём выравнивания контигов относительно референс-генома с помощью программы BLAST и объединения ориентированных контигов поли-N-линкерами в одну последовательность. Аннотацию выполняли с использованием PAGIT v1.

Результаты. В результате секвенирования для образца MOW-F5C получена консенсусная последовательность протяжённостью 146925 нуклеотидов, которая на 90% воспроизводила полногеномную последовательность вируса. Неотсеквенированные регионы относились к фланкирующим участкам (DR), содержащим повторяющиеся последовательности. В ходе аннотации генома MOW-F5C выявлено 100 кодирующих открытых рамок считывания (CD_s).

Выводы. Впервые в РФ проведено полногеномное секвенирование клинического эндогенного изолята *Human betaherpes virus* 6В с использованием технологии коротких прочтений. Полученная информация, в совокупности с уже имеющимися международными данными по полногеномным последовательностям как *Human betaherpes virus* 6В, так и *Human betaherpes virus* 6А, будет необходима для изучения особенностей популяции и географической стратификации данных вирусов, в том числе и их хромосомно-интегрированных (эндогенных) форм, передающихся по наследству.

Нуклеотидная последовательность российского клинического эндогенного изолята *Human betaherpesvirus* 6В MOW-F5C депонирована в базу данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номером MN242397.1.

Литература

1. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. Update on infections with human herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2017. Vol. 47. P. 83–91. DOI: 10.1016/j.medmal.2016.09.004
2. Arbuckle J., Medveczky M., Luka J., Hadley S., Luegmayr A., Ablashi D., et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. P. 5563–5568. DOI: 10.1073/pnas.0913586107
3. Telford M., Navarro A., Santpere G. Whole genome diversity of inherited chromosomally integrated HHV-6 derived from healthy individuals of diverse geographic origin. *Sci. Rep.* 2018; Vol. 8. P. 3472. DOI: 10.1038/s41598-018-21645-x
4. Flamand L. Chromosomal integration by Human herpesviruses 6A and 6B. *Adv. Exp. Med Biol.* 2018. Vol. 1045. P. 209–226. DOI: 10.1007/978-981-10-7230-7_10
5. Домонова Э.А., Сильвейстрова О.Ю., Гоптарь И.А., Кулешов К.В., Никифорова А.В., Матосова С.В., Шипулина О.Ю. Первые данные о распространенности в России хромосомно-интегрированного *Human betaherpesvirus* 6A/B, передаваемого по наследству. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2019. № 9(4). С. 43–50. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/epidem.2019.9.4.43-50>
Domonova E.A., Silvestrova O.Yu., Goptar I.A., Kuleshov K.V., Nikiforova A.V., Matosova S.V., Shipulina O.Yu. [First data on the prevalence of inherited chromosomally integrated *Human betaherpesvirus* 6A/B in Russia]. *Epidemiologia i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy* 2019; 9(4): 43–50 (In Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/epidem.2019.9.4.43-50>
6. Zhang E, Cotton V, Hidalgo-Bravo A., Huang Y., Bell A., Jarrett R., Wilkie G., Davison A., Nacheva E. et al. HHV-8-unrelated primary effusion-like lymphoma associated with clonal loss of inherited chromosomally-integrated *human herpesvirus* 6A from the telomere of chromosome 19q. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 22730. DOI: 10.1038/srep22730
7. Домонова Э.А., Сильвейстрова О.Ю., Гоптарь И.А., Кулешов К.В., Пасхина И.Н., Никифорова А.В., Шипулина О.Ю., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Первый случай выявления и лабораторного подтверждения наследственной передачи хромосомно-интегрированного *Human betaherpesvirus* 6A в Российской Федерации. *Инфекционные болезни*. 2019. № 17. С. 5–14. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-5-14
Domonova E.A., Silvestrova O.Yu., Goptar I.A., Kuleshov K.V., Paskhina I.N., Nikiforova A.V., Shipulina O.Yu., Markelov M.L., Shipulin G.A., Maleev V.V. [First laboratory confirmed case of hereditary transmission of chromosomally integrated *Human betaherpesvirus* 6A in the Russian Federation]. *Infekc. bolezni (Infectious diseases)*. 2019; 17(3): 5–14. (In Russ.). DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-5-14



ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПРИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПРИЧИН ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ ПАЦИЕНТОВ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

Л.Г. Кудрявцева¹, В.И. Сергевнин²

¹ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии имени С.Г. Суханова» Министерства здравоохранения РФ, Пермь;

²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь

Ключевые слова: кардиохирургический стационар, вспышка внутрибольничных гнойно-септических инфекций, *Klebsiella pneumoniae*, генетическое типирование возбудителя

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-96>

APPLICATION OF PATHOGEN GENETIC TYPING IN THE EPIDEMIOLOGICAL DIAGNOSIS GROUP MORBIDITY CAUSES PURULENT-SEPTIC INFECTIONS IN CARDIAC SURGERY HOSPITAL PATIENTS

L.G. Kudryavtseva¹, V.I. Sergevnin²

¹Federal Centre for Cardiovascular Surgery named after S.G. Sukhanov under the Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia;

²Perm State Medical University named after E. A. Wagner, Perm, Russia

Key words: cardiac surgery center, outbreak of purulent septic infections, *Klebsiella pneumoniae*, genetic typing of pathogens

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-96>

Введение. В медицинских организациях нередко возникают вспышки гнойно-септических инфекций (ГСИ). Причины таких ситуаций остаются недостаточно ясными. В значительной степени это обусловлено тем, что далеко не всегда используется генотипирование возбудителей ГСИ, что не позволяет безусловно доказать или исключить связи между штаммами микроорганизмов, выделенными от разных пациентов и из больничной среды.

Цель исследования. Эпидемиологическая диагностика групповой заболеваемости ГСИ в кардиохирургическом стационаре с использованием генетического типирования возбудителя.

Материалы и методы. На фоне увеличения заболеваемости ГСИ клебсиеллезной этиологии (пневмония, инфекция мочевыводящих путей, инфекция кровотока) среди пациентов кардиохирургического стационара было генотипиро-

вано 13 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, изучена их адгезивная активность, чувствительность к 29 антибиотикам и к трём дезинфицирующим средствам (ДС). Генотипирование культур проводили методом RAPD-ПЦР с праймером M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT). ДНК выделяли по методике, описанной Stone G.G. и соавторами. Праймер был синтезирован ООО «Синтол» (г. Москва). Амплификацию осуществляли на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,0% агарозном геле в трис-боратном буфере при напряжении электрического поля 6 В/см. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

Результаты. По данным генотипирования возбудителя выявлено 5 не связанных между собой эпидемических очагов ГСИ клебсиеллёзной этиологии с 11 случаями инфекции. Все штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в эпидемических очагах, были полирезистентными к антибиотикам и в 61,5% случаев устойчивы к ЧАС-содержащему дезинфектанту. Из 13 изученных культур две имели среднюю адгезивность, 11 были не адгезивными.

Выводы. Полученные результаты указывают, что с помощью генотипирования возбудителя может быть доказана или исключена связь между заболевшими внутрибольничными ГСИ. Профили адгезивной активности, устойчивости к антибиотикам и ДС штаммов микроорганизмов не могут рассматриваться в качестве безусловного признака эпидемиологической связи или её отсутствия между заболевшими.



ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОТОВЫХ КОМПЛЕКСОВ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

Ю.В. Михайлова, М.А. Тюменцева, А.А. Шеленков, Ю.Г. Янушевич,
А.И. Тюменцев, В.Г. Акимкин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В представленном исследовании мы оценили эффективность работы и неспецифическую активность CRISPR/CAS комплекса с одной из выбранных направляющих РНК с помощью технологии CIRCLE-seq. В качестве последовательности-мишени для редактирования генома был использован ген, кодирующий хемокиновый рецептор CCR5 человека. Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о корректном выборе направляющей РНК и эффективной работе применённого CRISPR/CAS рибонуклеопротеинового комплекса. Технология CIRCLE-seq показала высокую чувствительность по сравнению с биоинформатическими методами предсказания нецелевой активности CRISPR/CAS комплексов. Мы планируем оценить эффективность работы и нецелевую активность CRISPR/CAS рибонуклеопротеиновых комплексов с другими направляющими РНК, немного скорректировав протокол CIRCLE-seq-технологии с целью снижения неспецифических разрывов ДНК и увеличения числа достоверных прочтений.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/CAS-комплексы, направляющие РНК, нецелевая активность, CIRCLE-seq-технология

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-98>

ASSESSMENT OF EFFICIENCY AND OFF-TARGET ACTIVITY OF CRISPR/CAS RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES

Y.V. Mikhaylova, M.A. Tyumentseva, A.A. Shelenkov, Y.G. Yanushevich,
A.I. Tyumentsev, V.G. Akimkin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

In this study, we assessed the efficiency and off-target activity of the CRISPR/CAS complex with one of the selected guide RNAs using the CIRCLE-seq technology. The gene encoding the human chemokine receptor CCR5 was used as a target sequence for genome editing. The results of this experiment indicate the correct choice of the guide RNA and efficient work of the CRISPR- CAS ribonucleoprotein complex used. CIRCLE-seq technology has shown high sensitivity compared to bioinformatic methods for predicting off-target activity of CRISPR/CAS complexes. We plan to evaluate the efficiency and off-target activity of CRISPR/CAS ribonucleoprotein complexes with other guide RNAs by slightly adjusting the CIRCLE-seq-technology protocol in order to reduce nonspecific DNA breaks and increase the number of reliable reads.

Key words: genome editing, CRISPR/CAS-complexes, guide RNA, off-target activity, CIRCLE-seq-technology

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-98>

Введение. Современные методы лечения ВИЧ-инфекции позволяют сдерживать скорость развития заболевания, но не приводят к его излечению. Антиретровирусная терапия является пожизненной, дорогостоящей и сопровождается накоплением побочных эффектов. Последние достижения науки позволили предложить принципиально новый подход к лечению ВИЧ-инфекции — генную терапию. Одним из направлений генной терапии ВИЧ считается применение технологий направленного редактирования генома с использованием программируемых нуклеаз, нацеленных на делецию хемокинового рецептора CCR5 с поверхности клеток иммунной системы человека, ответственного за проникновение ВИЧ в клетки. Важно отметить, что уже разработанные препараты имеют ряд недостатков, среди которых — потенциальная токсичность из-за неспецифического эффекта последних, а также относительно низкая эффективность модификации клеток [1]. Именно поэтому необходимо разрабатывать более совершенные и безопасные подходы для терапии ВИЧ-инфекции, что может быть реализовано с помощью готовых рибонуклеопротеиновых комплексов системы CRISPR/CAS.

Следует отметить, что специфичность CRISPR/CAS комплексов не является абсолютной, что недопустимо для некоторых важных приложений, в том числе и генной терапии. Мутации, возникшие в результате внесения разрыва ДНК в нецелевом локусе, потенциально могут менять активность генов и приводить к опухолевому перерождению клеток. Проблема осложняется ещё и индивидуальными особенностями генома каждого человека [2]. Одна из стратегий определения нецелевых сайтов системы CRISPR/CAS основывается на поиске потенциальных локусов, связывающихся с направляющей РНК (sgРНК), с помощью биоинформатических методов, так называемое предсказание *in silico*. Собраны статистические данные, которые помогают предсказывать эффективность sgРНК по её последовательности, а также данные о влиянии количества, характера и положения некомплементарных нуклеотидов на эффективность sgРНК, что позволяет предсказывать нецелевую активность.

Кроме того, для выявления мутаций, не являющихся целевыми, были специально разработаны методы, основанные на определённом варианте скрининга для выявления мутаций не только в предсказанных и выбранных областях, но и в масштабе всего генома. На сегодняшний день метод CIRCLE-seq (от англ. Circularisation for *in vitro* reporting of cleavage effects by sequencing) является высокочувствительным и наиболее эффективным, с точки зрения секвенирования, подходом *in vitro* для полногеномного определения нецелевых сайтов расщепления нуклеаз CRISPR/CAS [3]. Согласно данному методу, геномная ДНК случайным образом фрагментируется, циркуляризируется с образованием ковалентно замкнутых молекул двунитевой ДНК. Полученные «кольца» расщепляются с помощью CAS9 как по целевым, так и по нецелевым

сайтам, что позволяет селективно секвенировать фрагменты генома, в которых образовались двуцепочечные разрывы, индуцированные нуклеазой CAS9. В данном сообщении представлены результаты работы по получению направляющих РНК системы CRISPR/CAS для оценки эффективности и неспецифической активности рибонуклеопротеиновых комплексов системы CRISPR/CAS *in vitro*. Неспецифическая активность CRISPR/CAS-комплекса с одной из выбранных направляющих РНК была оценена с помощью технологии CIRCLE-seq. В качестве последовательности-мишени для редактирования генома был использован ген, кодирующий хемокиновый рецептор CCR5 человека, который отвечает за проникновение вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в клетки.

Материалы и методы

Выделение и фрагментация ДНК. Геномную ДНК из культуры клеток человека PM-1 выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции, предварительно клетки лизировали и обрабатывали протеиназой, используя соответствующие реагенты из набора Blood and Tissue kit (Qiagen). Для дальнейших манипуляций 50 микрограмм полученной ДНК подвергались фрагментации с помощью ультразвука до средней длины 300 пар нуклеотидов на приборе Covaris M220. Фрагментированную ДНК очищали на шариках AmpureXPSPI (Beckman) в соотношении 1:1.8 и элюировали в однократном ТЕ-буфере. Стартовое количество ДНК было рассчитано для двух образцов — тестируемого и отрицательного контроля, который проходит все стадии протокола, за исключением этапа обработки образцов CRISPR/CAS-рибонуклеопротеиновым комплексом. В случае отрицательного контроля комплекс заменяется водой.

Подробно CIRCLE-seq-протокол, согласно которому мы следовали, представлен в работе Lazzarotto et al., 2018 [4]. Ниже мы акцентируем внимание на основных его этапах.

Циркуляризация ДНК. К очищенной фрагментированной ДНК лигировали адаптер, содержащий урацил в его одноцепочечной концевой петлевой структуре. Селекция частиц с лигированным адаптером осуществлялась с помощью экзонуклеазы лямбда и экзонуклеазы I *E. coli* (New England Biolabs). ДНК с лигированным адаптером подвергалась ферментативной обработке с помощью ферментов USER и T4 полинуклеотидкиназы (New England Biolabs) для освобождения четырёх нуклеотидных палиндромных «выступов» на обоих концах. Полученные структуры замыкали в кольца с помощью T4 ДНК-лигазы (New England Biolabs) при относительно низкой концентрации ДНК (5 нг/мкл), что сдвигает реакцию в пользу внутримолекулярного лигирования. В дальнейшем селекцию полученных кольцевых структур проводили с помощью экзонуклеазы VRecBCD (New England Biolabs).

Приготовление CRISPR/CAS-рибонуклеопротеиновых комплексов и расщепление кольцевой ДНК *in vitro*. CRISPR/CAS-рибонуклеопротеиновые комплексы были приготовлены, как описано ранее [5].

Приготовление библиотеки для высокопроизводительного секвенирования (NGS). К образцам после реакции с CRISPR/CAS-рибонуклеопротеиновыми комплексами и очистки на шариках Ampure XPSPRI (Beckman) лигировали адаптеры для секвенирования с выступающим Т на концах с помощью Blunt/TA Ligase MasterMix (New England Biolabs). С очищенных на шариках лигазных смесей ставили ПЦР для индексирования полученных библиотек. Индексированные библиотеки пулировались в эквимольном соотношении, качество пулов проверяли с помощью «High Sensitivity DNA Kit» (Agilent).

Секвенирование и анализ данных. Высокопроизводительное секвенирование осуществляли на приборе «HiSeq 1500» с использованием наборов «HiSeq PE Rapid Cluster Kitv2» и «HiSeq Rapid SBS Kitv2» и «HiSeqRapidSBSKitv2» (Illumina).

Сырые данные с секвенатора HiSeq были обработаны и демультиплексированы с помощью программы bcl2fastq v2.20 (Illumina). Тестируемый и контрольный образцы содержали приблизительно 30 млн парных прочтений каждый. Дальнейшая обработка данных, включая поиск последовательности, направляющей РНК, картирование прочтений на геном человека и графическое представление результатов анализа были выполнены с помощью программы circleseq (<https://github.com/tsailabS/circleseq>) [3]. Для картирования была использована версия генома человека hg38.101 из базы данных Ensembl.

Результаты. Для создания направляющих РНК, специфичных к гену, кодирующему хемокиновый рецептор CCR5 человека, были использованы современные алгоритмы *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей и программы, находящиеся в открытом доступе, включая Benchling (<https://www.benchling.com/molecular-biology>). Был составлен перечень участков гена, кодирующего хемокиновый рецептор CCR5 человека, с теоретически рассчитанной вероятностью их расщепления. Для пилотного эксперимента из составленного перечня был выбран 1 участок, соответствующий 2-му экзону гена, кодирующего хемокиновый рецептор CCR5 человека.

Для получения направляющей РНК с целью редактирования генома разработан набор специфических олигонуклеотидов, который позволяет получать ПЦР-продукты, кодирующие выбранную направляющую РНК, содержащую РНК-шпильку, которая распознается РНК-направляемыми ДНК-эндонуклеазами CAS. Полученные ПЦР-продукты служат матрицей для синтеза направляющих РНК методом *in vitro* транскрипции. Полученная таким методом направляющая РНК (5'-GCAATGTGTCAACTCTTGACAGTTT TAGAGCTAGAA ATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG

AGTCGGTGC-3') использована для оценки эффективности и неспецифической активности рибонуклеопротеиновых комплексов системы CRISPR/CAS *in vitro*.

Согласно анализу данных высокопроизводительного секвенирования сконструированных CIRCLE-seq-библиотек, нам удалось определить 8 нецелевых областей, 4 из которых аннотированы (таблица). Определённые в эксперименте *in vitro* нецелевые области затрагивают разные хромосомы — Chr1, 2, 4, 5, 6, 7, 16 и 20. Кроме того, целевая и неспецифическая активности выбранной направляющей РНК были оценены *in silico* с помощью четырёх программ: Benchling, RGEN Tools, CRISPR-OFF webster и COSMID. Как и предполагалось, целевой участок (CCR5) был точно определён с помощью всех указанных ресурсов. Что касается нецелевых областей, то одна из коротких неаннотированных последовательностей (Chr5: 32668400-32668421) определена с помощью трёх программ (Benchling, RGEN Tools и COSMID), другая короткая неаннотированная последовательность (Chr16:

Определение неспецифической активности, выбранной направляющей РНК с помощью метода CIRCLE-Seq и *in silico* программ

№ п/п	Координаты	Название	CIRCLE-Seq	Используемые <i>in silico</i> программы			
				Benchling	RGEN Tools	CRISPR-OFF web-server	COSMID
1	Chr5: 32668400-32668421	–	+	+	+	–	+
2	Chr1: 54280199-54280220	SSBP3 (single stranded DNA binding protein 3)	+	–	–	–	–
3	Chr16: 80887195-80887216	–	+	–	+	+	–
4	Chr4: 2335912-2335933	ZFYVE28 (Homo sapiens zinc finger FYVE-type containing 28)	+	+	–	–	–
5	Chr6: 163967746-163967767	AL078602.1 (lncRNA, noveltranscript)	+	–	–	–	–
6	Chr7: 135159834-13515985	CYREN (cell cycle regulator of non-homologous end joining isoform)	+	–	–	–	–
7	Chr20: 47166645-47166666	–	+	–	–	–	–
8	Chr2: 37562175-37562196	–	+	–	–	–	–

80887195-80887216) идентифицирована только с помощью программ RGEN Tools и CRISPR-OFF webserver. Дополнительно с помощью ресурса Benchling в качестве неспецифической мишени была определена последовательность, аннотированная как ZFYVE28 (цинковопальцевая нуклеаза типа FYVE). Таким образом, с помощью четырёх программ по предсказанию нецелевой активности *in silico* выбранной нами направляющей РНК удалось определить три нецелевых участка, два из которых не аннотированы. Причём эти три участка были также определены и в эксперименте *in vitro* с помощью технологии CIRCLE-seq (таблица).

Результаты проведённого пилотного эксперимента свидетельствуют о корректном выборе направляющей РНК и эффективной работе применённого CRISPR/CAS-рибонуклеопротеинового комплекса. Полученные результаты эксперимента *in vitro* свидетельствуют о высокой чувствительности выбранной нами технологии оценки неспецифической активности CRISPR/CAS-комплексов (CIRCLE-seq). Согласно анализу данных секвенирования сконструированных CIRCLE-seq-библиотек, некоторые этапы протокола требуют небольшой доработки, что позволит снизить частоту неспецифических разрывов, тем самым увеличив количество достоверных прочтений. В дальнейшем мы планируем оценить эффективность работы и нецелевую активность CRISPR/CAS-рибонуклеопротеиновых комплексов с другими направляющими РНК, скорректировав протокол CIRCLE-seq-технологии.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

Литература

1. Tebas P., Stein D., Tang W., Frank I., Wang S., Lee G. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2014. Vol. 370. P. 901–10. DOI: 10.1056/NEJMoa1300662
2. Банников А.В., Лавров А.В. CRISPR-CAS9 — король геномного редактирования. *Молекулярная биология.* 2017. № 51 (4). С. 582–594.
Bannikov A.V., Lavrov A.V. Crispr/CAS9. [The king of the tools for genome editing. *Molecular biology*] 2017; 51 (4): 582–594. (In Russ.).
3. Tsai S., Nguyen N., Malagon-Lopez J., Topkar V., Aryee M., Joung J. [CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-CAS9 nuclease off-targets] *Nat. Methods.* 2017. Vol. 14. P. 607–614. DOI:10.1038/nmeth.4278
4. Lazzarotto C., Nguyen N., Tang X., Malagon-Lopez J., Guo J.A., Aryee M.J., Joung J., Tsai S.Q. Defining [CRISPR-CAS9 genome-wide nuclease activities with CIRCLE-seq] *Nat. Protoc.* 2018. Vol. 13. P. 2615–2642. DOI: 10.1038/s41596-018-0055-0
5. Акимкин В.Г., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Шагин Д.А. Способ получения препарата рекомбинантной нуклеазы CAS, по существу, свободного от бактериальных эндотоксинов, полученный данным способом препарат и содержащий его набор для использования в системе CRISPR-CAS. Патент РФ № 2707542. 2019. Бюл. № 33.



АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЙ НАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В СКОТОВОДСТВЕ И СВИНОВОДСТВЕ С ПОЗИЦИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ МОЛОДНЯКА В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

А.М. Нагорных, А.И. Тюменцев, М.А. Тюменцева, В.Г. Акимкин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

На протяжении своей истории человек отбирал животных, имеющих наиболее полезные качества, и, проводя их внутривидовое скрещивание, способствовал закреплению этих особенностей. Одним из факторов при разведении животных всегда оставалась выживаемость в неонатальный период, а с появлением возможностей направленного геномного редактирования, посредством которого в геноме возникают мутации, зачастую негативные для здоровья, высокая выживаемость генетически отредактированных животных становится первоочередной задачей.

Ключевые слова: технологии направленного редактирования генома, сельскохозяйственные животные, крупный рогатый скот, свиньи

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-104>

ANALYSIS OF PROMISING OPPORTUNITIES FOR THE USE OF GENOME EDITING TECHNOLOGIES IN CATTLE AND PIG INDUSTRY IN TERMS OF SURVIVAL OF YOUNG ANIMALS IN THE NEONATAL PERIOD

A.M. Nagornykh, A.I. Tyumentsev, M.A. Tyumentseva, V.G. Akimkin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

Throughout his history, man has selected animals that have the most useful features by carrying out their intraspecific crossing leading to the fixation of these features. Survival in the neonatal period has always remained one of the most important factors in breeding animals, and with the advent of genome editing, through which mutations, often negative for health, appear in the genome, the high survival rate of genetically edited animals becomes a paramount issue.

Key words: technologies for genome editing, agricultural animals, cattle, pigs

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-104>

Цель исследования. Выявить в современных литературных источниках примеры перспективного улучшения хозяйственно полезных качеств крупного рогатого скота и свиней с помощью технологий направленного редактирования генома и определить эффективность применяемых технологий с точки зрения выживаемости молодняка в неонатальный период.

Основная часть. До недавнего времени наиболее популярным методом определения генов, отвечающих за важные для человека качества сельскохо-

зяйственных животных, был метод поиска генов-кандидатов с последующим детальным анализом этих генов в геномах животных [1].

В 2009 г. был опубликован первый геном одного из самых распространённых и полезных для человечества животных — крупного рогатого скота (КРС) [1]. Исследование генома КРС позволило изучить последовательность возникновения эволюционных изменений у жвачных животных: превращать скудные питательными веществами корма растительного происхождения в богатые белками продукты животноводства — мясо и молоко.

Свинья стала привлекательным для domestikации видом приблизительно 10 000 лет назад. Понять это удалось, сравнив районы хромосомных перестроек в геномах свиньи, КРС, человека, лошади, собаки и мыши, определив 192 эволюционных хромосомных разрыва, произошедших в геноме свиньи, но не наблюдаемых у КРС [2]. Это исследование дало почву для предположения, что восприятие вкуса свиньями могло отличаться от вкусовых аналитических качеств других животных и человека. Роль здесь принадлежит генам, участвующим в восприятии уровня соли, содержащегося в кормах, — *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G*. Выяснилось, что у свиней ген *SCNN1B* дублирован и транслоцирован, в связи с чем вкусовое восприятие свиньи резко отличается от человеческого. Помимо этого, восприятие горьких веществ у свиней превышает человеческое более чем в 10 000 раз в связи с тем, что у человека 24 гена вкусовых рецепторов представлены в хромосомах 7 и 12, реагирующих на горький вкус. У свиней же 17 генов вкусовых рецепторов этого типа представлены в хромосомах 5 и 18, причём они подверглись хромосомным перестройкам [1]. Поэтому такая способность свиней перерабатывать непригодные для кормления многих видов животных корма и превращать их в питательные вещества (мясо) сыграла немаловажную роль в domestikации этих животных.

До момента появления систем направленного редактирования генома основными инструментами для получения высокопродуктивных сельскохозяйственных животных были отбор и скрещивание особей, имеющих максимально выраженные полезные для хозяйственной деятельности признаки, такие как высокая продуктивность (молоко, мясо), фертильность, устойчивость к заболеваниям и другие. Даже с разработкой методов трансгенеза, позволивших изменять геном на молекулярном уровне, эффективность улучшения полезных качеств сельскохозяйственных животных осталась приблизительно на том же уровне [3]. Поэтому появление таких эффективных инструментов, как ZFNs, TALENs и CRISPR/CAS, послужило мощным драйвером для создания линий высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

Учитывая такие полезные для обеспечения продовольственной безопасности населения особенности свиней, как высокая продуктивность, неприхотли-

вость в кормлении и содержании и сравнительно небольшое время достижения кондиционных показателей, китайские ученые применили технологию CRISPR/CAS9 для создания нокаутированных свиней по гену *vWF*, мутация которого у человека вызывает болезнь Виллебранда, сопровождающуюся спонтанными кровотечениями. Для придания свиньям хозяйственно полезного свойства, заключающегося в активном обескровливании животного после убоя, авторы внедрили генетические конструкции методом цитоплазматической инъекции мПНК CAS9 и sgПНК в зиготы с последующей трансплантацией суррогатным свиноматкам, что привело к возникновению целевой делеции на участке гена *vWF* у 62% родившихся поросят [3]. С точки зрения создания модели крупного животного для исследования генетических заболеваний человека данное исследование полезно и может иметь перспективы. Однако с точки зрения продовольственной безопасности из 76 инъектированных 5 суррогатным свиноматкам эмбрионов, лишь у троих из которых супоросность прошла успешно, родилось всего 16 поросят (2 из них погибли после рождения), и только у 10 была подтверждена хозяйственно ценная делеция в гене. При этом стоит учесть, что полученные животные, по всей видимости, требовали особого ухода, что, несомненно, повлечёт увеличение затрат на содержание и уход, поставив под сомнение рентабельность полученного полезного качества.

В процессе эволюции свиньи практически утратили ключевой элемент неподвижного термогенеза — белок термогенин (*UCP1*), в котором особенно остро нуждается молодняк. Группа ученых во главе с Zheng Q. показала возможность создания нок-ин по гену *UCP1* свиней посредством CRISPR/Cas9-опосредованной вставки *UCP1* мыши в эндогенный локус *UCP1* свиньи. Скрещивание полученного таким образом самца с самками дикого типа подтвердило правило менделевской сегрегации трансгенов среди потомства F1, а также показало отсутствие влияния элементов системы CRISPR/CAS9 на фертильность. У полученных свиней отмечали улучшенную терморегуляцию и снижение объёмов отложения белой жировой ткани, что в некоторых государствах является приоритетным направлением свиноводческих программ [4]. В общей сложности 2553 клонированных эмбриона были перенесены в яйцеводы 13 суррогатных реципиентов. Были установлены три беременности, которые достигли срока. Двенадцать поросят-самцов родились естественным путем из трёх пометов. Материалы, полученные в результате этого исследования, могут послужить базой для создания новых или улучшения уже существующих пород свиней с целью повышения их терморегулирующих способностей и повышения качества мяса.

В свою очередь, американские исследователи успешно провели другое серьёзное исследование — с помощью технологии CRISPR/CAS9 им удалось создать нокаутированных по гену *CD163* свиней, что минимизировало вос-

приимчивость животных к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней, причиняющему ежегодно большой ущерб свиноводческой отрасли во всём мире [4]. В случае получения распространения подобного полезного свойства повсеместно необходимость в вакцинации поголовья против вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней исчезнет, что позволит сократить затраты фермеров.

Другим заболеванием, наносящим большой экономический ущерб сельскому хозяйству, является туберкулёз КРС, возбудителем которого является *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), патогенный и для человека. Группе ученых из КНР удалось получить 9 особей КРС, устойчивых к *M. bovis*. Для индукции вставки гена в выбранный локус использовалась одиночная никаза CAS9 (CAS9n). С её помощью был произведен одноцепочечный разрыв ДНК, благодаря которому стало возможно встраивание гена природно-резистентного ассоциированного макрофагального белка 1 (NRAMP1) в фибробластах плода КРС. Соматическое клонирование осуществлялось посредством переноса ядер из культуры фибробластов в ооциты-реципиенты. В результате было получено 20 трансгенных телят, 11 из которых проявляли жизнеспособность более 3 месяцев и с помощью которых в итоге удалось показать снижение восприимчивости к *M. bovis* [5]. При этом отмечается, что из 4819 эмбрионов до стадии бластоцисты развились 1278, а с учётом того, что использовался 421 суррогатный реципиент, полезный выход в количестве 20 телят выглядит скромным.

Наличие рогов у КРС ведет к постоянному травматизму как самих животных, так и обслуживающего персонала. Кроме того, при постоянной конкуренции во время кормления некоторые особи не могут получать полноценный доступ к кормушкам, вследствие чего происходит снижение продуктивности. Сама процедура обезроживания является довольно затратной и негуманной, поэтому привлекает постоянное внимание со стороны представителей зоозащитных организаций. В 2016 г. группой американских ученых были сообщены результаты о применении технологии TALEN для создания безрогих особей КРС. Посредством TALEN производилось внедрение предполагаемого аллеля P_C POLLED в геном фибробластов эмбриона КРС. Полученные пятеро жизнеспособных гомозиготных по P_C POLLED телят не имели признаков зачаточных рогов [5].

Результаты. Учитывая, что полученные с применением технологий редактирования генома животные обладают низкой жизнеспособностью, мы определили процентное соотношение количества молодняка, выжившего в неонатальный период, к общему количеству новорождённых, косвенно определив таким образом перспективность использования той или иной системы редактирования генома. Результаты приведены в таблице.

Процентное соотношение количества молодняка, выжившего в неонатальный период, к общему количеству новорождённых, полученного посредством применения систем направленного редактирования генома с целью улучшения хозяйственно полезных качеств

Вид животного	Редактируемый признак	Используемая система направленного редактирования генома		
		ZFNs	TALENs	CRISPR/CAS
КРС (соотношение количества выжившего молодняка к общему количеству рождённых, %)	Устойчивость к заболеваниям		56,5 ^[5]	55 ^[5]
	Улучшение качества продукции	12,5 ^[5]	40 ^[5] 25 ^[5]	
Свиньи (соотношение количества выжившего молодняка к общему количеству рождённых, %)	Устойчивость к заболеваниям			35,7 ^[4] 78,6 ^[4]
	Улучшение качества продукции	47,4 ^[4]		87,5 ^[3] 100 ^[4] 100 ^[4]

Выводы. Конечно, мы не ставили задачу учесть все нюансы описанных в литературных источниках исследований, однако, исходя из данных, отражённых в таблице, можно сделать вывод о наибольшей перспективности применения технологии CRISPR/CAS при получении животных-основателей линий с улучшенными хозяйственно полезными качествами.

Литература

1. Ларкин Д. М. Генетика домашних и сельскохозяйственных млекопитающих. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. №18 (1). С. 53–60.
Larkin D. M. Genetics of domestic and agricultural mammals. *Vavilovskiy jurnal genetiki i seleksii* 2015; 18(1): 53 – 60. (In Russ.).
2. Groenen M., Archibald A., Uenishi H., Tuggle C., Takeuchi Y., Rothschild M. et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 2012. Vol. 491 (7424). P. 393–398. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11622>
3. Ларкина Т. А., Крутикова А. А., Козикова Л. В. Редактирование генома сельскохозяйственных животных с помощью технологии CRISPR/CAS9. *Молочнохозяйственный вестник* 2018. № 3 (31). С. 24–34.
Larkina T. A., Krutikova A. A., Kozikova L. V. Editing the genome of farm animals using CRISPR/Cas9 technology. *Molochnokhoyazystvenniy vestnik* 2018; 3 (31): 24-34. (In Russ.).
4. Yang H., Wu Z. Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine. *Front. Genet.* 2018. Vol. 9 (360). DOI: [10.3389/fgene.2018.00360](https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00360)
5. Van Eenennaam, Alison L. Application of genome editing in farm animals: Cattle. *Transgenic Res.* 2019. Vol. 28 (2). P. 93–100. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00141-6>
6. Groenen M., Archibald A., Uenishi H., Tuggle C., Takeuchi Y., Rothschild M. et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 2012. Vol. 491(7424). P. 393–398. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11622>



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОФИЛЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕТОДОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ

М.И. Терехова¹, Е.В. Рогачева², И.А. Деревянченко³, Л.А. Краева²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург;

²ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург

Постоянный рост числа устойчивых к антибиотикам изолятов *L. monocytogenes* создаёт необходимость определения генетического профиля антибиотикорезистентности для обеспечения надлежащей антибактериальной терапии листериоза. В данной работе было произведено полногеномное секвенирование и сборка *de novo* геномов 8 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных на территории Санкт-Петербурга и Вологодской области. Определён MLST ST тип, филогенетическая линия, профиль PCR-серогрупп *in silico*, произведён поиск генов и мутаций, связанных с антибиотикорезистентностью. Генетический состав показал достаточный уровень консервативности между штаммами с различным ареалом происхождения и включал в себя широкий спектр разнообразных механизмов устойчивости к антибиотикам. Наибольшую обеспокоенность вызывает наличие у штаммов *Listeria* генетических факторов резистентности к β -лактамным антибиотикам, фторхинолонам, тетрациклинам и макролидам, активно используемым при лечении листериозной инфекции. Приведённые данные являются важной частью санитарно-эпидемиологического надзора листериоза в России.

Ключевые слова: листериоз, антибиотикорезистентность, полногеномное секвенирование, *mlst*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-109>

WHOLE-GENOME SEQUENCING-BASED ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS FROM SAINT-PETERSBURG AND THE VOLOGDA REGION

M.I. Terekhova¹, E.V. Rogacheva², I.A. Derevyanchenko³, L.A. Kraeva²

¹St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia;

³St. Petersburg Center for Hygiene and Epidemiology», Saint Petersburg, Russia

The increasing number of antibiotic-resistant isolates of *L. monocytogenes* is required to establish a genotypic resistance profile to ensure appropriate antibiotic therapy of listeriosis. In this study, whole-genome sequencing and *de novo* assembly was performed on *L. monocytogenes* strains from St. Petersburg and the Vologda region. We obtained the MLST ST, phylogenetic lineage and PCR-serogroups *in silico* for isolates under the study, revealed genes and mutations

associated with antibiotic resistance. In general, the genetic composition was similar between the strains from different regions and included a wide range of antibiotic resistance mechanisms. *Listeria* strains possessed genes that code for resistance to β -lactam antibiotics, fluoroquinolones, tetracyclines and macrolides, — classes that are commonly used in the treatment of listeria infection. The present study is important in the sanitary and epidemiological surveillance of listeriosis in Russia.

Key words: listeriosis, antibiotic resistance, whole-genome sequencing, *mlst*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-109>

Введение. *Listeria monocytogenes*, основной этиологический агент листериоза, обладает высокой адаптивностью и способностью выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды. Повсеместное распространение листерий в природе создаёт максимально благоприятные условия для контаминации продуктов и развития пищевой инфекции. Факторы риска имеют принципиальное значение в развитии листериоза, в связи с чем наиболее высокие уровни заболеваемости встречаются у иммунокомпрометированных лиц, беременных женщин, новорождённых и пожилых людей [1]. Таким образом, инфекция зачастую приобретает тяжёлое течение и приводит к высокому уровню летальности (до 30%), несмотря на лечение антибиотиками [2]. Недавние исследования сообщают о росте числа устойчивых к антибиотикам изолятов, выделенных из окружающей среды, пищевых продуктов и животных [1]. Мониторинг развития устойчивости к антибиотикам имеет первостепенное значение для обеспечения надлежащей антибактериальной терапии листериоза в будущем.

Цель исследования. Генотипирование и определение профиля антибиотикорезистентности циркулирующих штаммов *L. monocytogenes* на территории Санкт-Петербурга и Вологодской области.

Материалы и методы. В работе использовано 8 штаммов *L. monocytogenes*, которые были выделены на территории Санкт-Петербурга (образцы 57, 193) и Вологодской области (образцы 16, 39, 42, 153, 197, 259). Среди них 7 штаммов выделены из пищевых продуктов и объектов окружающей среды и один штамм — из ликвора пациента (образец 259).

Полногеномное секвенирование идентифицируемых бактерий производили на платформе автоматического секвенатора Illumina в режиме парно-концевого прочтения. Сборка *de novo* бактериальных геномов осуществлялась на основе программы Unicycler v0.4.8.

Генотипирование производилось на основе мультилокусных последовательностей (MLST) и определением профиля PCR-серогруппы с использованием базы данных Institut Pasteur, France [3]. База данных MLST производит поиск по 7 локусам (*abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*) с 1799 различными вариан-

тами аллелей, база данных PCR-серогрупп — по 5 локусам (lmo1118, lmo0737, ORF2110, ORF2819, prs) с 142 различными вариантами аллелей.

Аннотация собранных геномов и идентификация генов, связанных с антибиотикорезистентностью, производилась с использованием пайплайна The RAST [4], программы Prokka 1.14.5, а также базы данных Institut Pasteur, France.

Результаты и обсуждение. На основании найденных локусов, определяемых при PCR серотипировании *in silico*, изоляты были отнесены к соответствующему профилю, включающему 2 или 3 предполагаемые серогруппы (таблица) [5]. Наиболее частыми (62,5%, $n = 5$) были серогруппы 1/2a, 3a. К II филогенетической линии были отнесены 6 (75%) изолятов, к I — 2 (25%). MLST-типирование показало большое разнообразие сиквенс-типов (ST) среди исследуемых образцов.

В целом профили устойчивости к антибиотикам для всех образцов, секвенированных в данном исследовании, были аналогичными. База данных Institut Pasteur, France выявила гены устойчивости к фосфомицину (fosX), линкомицину (lin), сульфаниламидам (sul) и фторхинолонам (norB). Мутации в генах *gyrA* и *gyrB*, также отвечающие за устойчивость к фторхинолонам, были выявлены при помощи аннотаций Prokka 1.14.5 и The RAST. Аннотированные геномы показали наличие белков семейства металло- β -лактамаз, которые являются наиболее частым механизмом устойчивости к β -лактамным антибиотикам. Ген устойчивости к тетрациклину *tetA* был выявлен среди всех изучаемых штаммов.

Решающую роль в развитии множественной лекарственной устойчивости играют АТФ-связывающие кассетные транспортеры (АВС-транспортеры), часть семейства транспортных белков, которые отвечают за резистентность

Результаты определения основных локусов серотипирования *in silico*, филогенетические линии, профили PCR-серогрупп и MLST ST образцов *L. monocytogenes*

№	lmo1118	lmo0737	ORF 2110	ORF 2819	Prs	Филогенетическая линия	PCR серогруппа	MLST ST
16	–	+	–	–	+	II	1/2a, 3a	37
39	+	+	–	–	+	II	1/2c, 3c	9
42	–	+	–	–	+	II	1/2a, 3a	121
57	–	+	–	–	+	II	1/2a, 3a	121
153	–	+	–	–	+	II	1/2a, 3a	101
193	–	–	–	+	+	I	1/2b, 3b, 7	288
197	–	+	–	–	+	II	1/2a, 3a	37
259	–	–	+	+	+	I	4b, 4d, 4e	1

к лекарствам и их низкую биодоступность за счёт активного экспорта веществ из клетки. К генам, найденным в изучаемых штаммах и кодирующим данные транспортеры, относятся: *macB*, отвечающий за монорезистентность к макролидам, *bceA* и *bceB* — к бацитрацину, *ddlA* и *ddlB* — к антрациклинам, а также гены, отвечающие за множественную лекарственную устойчивость, — *bmr3*, *ybhS*, *ybhF*, *emrY*, *emrD*, *bmrA*, *merA*, *EmrB*, *norM*, *yheI*, *yheH*, *yfmO*, *mdtL*.

Выводы. В данной работе использован метод полногеномного секвенирования для идентификации генетических вариантов и определения профиля антибиотикорезистентности штаммов *L. monocytogenes*, циркулирующих в Санкт-Петербурге и Вологодской области. Была произведена сборка *de novo* геномов 8 штаммов с определением MLST ST типа, филогенетической линии и профиля PCR-серогрупп, необходимых для эпидемиологического контроля и сравнения изолятов в популяции. Генетический состав показал достаточный уровень консервативности между штаммами с различным ареалом происхождения и включал в себя широкий спектр разнообразных механизмов устойчивости к антибиотикам. Наибольшую обеспокоенность вызывает наличие у штаммов *Listeria* генетических факторов резистентности к β -лактамным антибиотикам, фторхинолонам, тетрациклинам и макролидам, активно используемым при лечении листериозной инфекции.

Владение информацией о генетических профилях резистентности листерий, выявляемых в продуктах питания и окружающей среде, позволяет не только более полно характеризовать циркулирующие на данной территории штаммы, но и осуществлять эпидемиологический прогноз заболеваемости листериозом, равно как и оценивать возможные перспективы антибиотикотерапии этой инфекции.

Литература

1. Olaimat A., Al-Holy M., Shahbaz H. et al. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018. Vol. 17. P. 1277–1292. doi: 10.1111/1541-4337.12387
2. Fischer M., Wamp S., Fruth A. et al. Population structure-guided profiling of antibiotic resistance patterns in clinical *Listeria monocytogenes* isolates from Germany identifies *pbpB3* alleles associated with low levels of cephalosporin resistance. *Emerg. Microbes Infect.* 2020. Vol. 9(1). P. 1804–1813. doi: 10.1080/22221751.2020.1799722.
3. Moura A., Tourdjman M., Leclercq A. et al. Real-time whole-genome sequencing for surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2017. Vol. 23. P. 1462–1470. doi: 10.3201/eid2309.170336. Epub 2017 Sep 17
4. Aziz R., Bartels D., Best A. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008. Vol. 9. P. 75. Published. 2008 Feb 8. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
5. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P. et al. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004. Vol. 42(8). P. 3819–3822. doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004



РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКОВ, ОЧИЩЕННЫХ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ, НА ПРИМЕРЕ НУКЛЕАЗ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

А.И. Тюменцев, М.А. Тюменцева, В.Г. Акимкин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Удаление бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков является одной из важнейших задач при получении высокоочищенных препаратов, пригодных для применения *in vivo*. На примере очистки препаратов рекомбинантных нуклеаз системы CRISPR/CAS предложена оптимальная технология получения очищенных от бактериальных эндотоксинов препаратов и проведён её сравнительный анализ с другими доступными методами. Удаление бактериальных эндотоксинов проводят с использованием детергента Triton X-114, добавленного до концентрации 1% в раствор, содержащий рекомбинантный белок. Показано, что содержание бактериальных эндотоксинов в растворах очищенных белков, полученных согласно предложенной технологии, составляет не более 0,3–1,5 ЕЭ/мл.

Ключевые слова: CRISPR/CAS нуклеаза, рекомбинантный белок, бактериальные эндотоксины

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-113>

DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR ENDOTOXIN REMOVAL FROM PROTEIN PREPARATIONS ON THE EXAMPLE OF NUCLEASES OF THE CRISPR/CAS SYSTEM

A.I. Tyumentsev, M.A. Tyumentseva, V.G. Akimkin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

Removal of bacterial endotoxins from solutions of recombinant proteins is one of the most important issues in the preparation of highly purified preparations suitable for *in vivo* use. An optimal technology for obtaining preparations purified from bacterial endotoxins has been proposed using purification of preparations of recombinant nucleases of the CRISPR/CAS system as an example. Efficacy of developed technology was compared with other available methods. Removal of bacterial endotoxins was carried out using Triton X-114 detergent added to a concentration of 1% to a solution containing the recombinant protein. It was shown that the content of bacterial endotoxins in solutions of purified proteins obtained according to the proposed technology is 0.3–1.5 EU/ml.

Key words: CRISPR/CAS nuclease, recombinant protein, bacterial endotoxins

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-113>

Введение. Для получения рекомбинантных белков в настоящее время широко применяют несколько гетерологичных систем экспрессии, среди которых клетки *Escherichia coli*; клетки дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и др.); клетки

насекомых; клетки растений и клетки млекопитающих. Каждая из упомянутых систем экспрессии имеет преимущества и недостатки, и окончательный выбор системы экспрессии, как правило, зависит от свойств целевого продукта [1].

К главным преимуществам экспрессии рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli* стоит отнести простоту и скорость получения штамма-продукта; сравнительно невысокую стоимость процесса разработки; масштабируемость процессов экспрессии и очистки, а также высокий выход целевого белка.

При получении рекомбинантных белков в клетках *E. coli* возникает проблема дополнительной очистки от бактериальных эндотоксинов, содержание которых в препаратах рекомбинантных белков регламентировано в Общей Фармакопейной Статье ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины». Пороговой пирогенной дозой считается доза, равная 5 ЕЭ/кг в 1 час для испытуемого препарата рекомбинантного белка, если он вводится пациенту любым парентеральным путем, кроме интратекального [2].

Например, белки семейства CRISPR/CAS обладают достаточно высокими значениями изоэлектрической точки ($pI > 9$), поэтому в растворах, имеющих физиологический $pH = 6,5-8,0$, имеют высокий положительный суммарный заряд. Именно высокий положительный суммарный заряд белков семейства CRISPR/CAS приводит к тому, что при выделении из клеток *E. coli* бактериальные эндотоксины разрушенных клеточных стенок бактерий, заряженные отрицательно, прочно связываются с выделяемыми белками семейства CRISPR/CAS. Стоит отметить, что получение рекомбинантных белков семейства CRISPR/CAS в других системах экспрессии, вероятно, не позволит получить препараты свободные от бактериальных эндотоксинов. Это связано с тем, что остаточные бактериальные эндотоксины могут содержаться как в питательной среде и добавках, применяемых при культивировании, так и в воде, которая используется при приготовлении буферных растворов.

Исходя из вышеперечисленного, нуклеазы системы CRISPR/CAS являются превосходными модельными препаратами рекомбинантных белков для разработки технологии по получению высокоочищенных рекомбинантных белков с минимальным содержанием бактериальных эндотоксинов, пригодных для применения *in vivo*.

Цель исследования. Разработка оптимальной технологии удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков, полученных в клетках *Escherichia coli*, на примере нуклеаз системы CRISPR/CAS.

Материалы и методы. В работе использовались методы хроматографической очистки, биохимические методы.

Результаты. Для удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков рекомендуют различные методы. Для разработки оптимальной

технологии удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков в качестве модельных препаратов были использованы нуклеазы семейства CRISPR/CAS. В процессе разработки были применены различные подходы, такие как изменения ионной силы раствора, изменения pH на различных стадиях хроматографической очистки, применение специализированных сорбентов и т. д.

Известно, что высокая ионная сила раствора может препятствовать прочному связыванию бактериальных эндотоксинов с поверхностью белка, имеющего высокий положительный суммарный заряд. Один из вариантов удаления бактериальных эндотоксинов предполагал дезинтеграцию бактериальных клеток штамма-продуцента в присутствии хлорида натрия в конечной концентрации 1 М, при этом все буферные растворы, используемые на стадии очистки на хроматографическом сорбенте Chelating Sepharose FF, также содержали хлорид натрия в конечной концентрации 1 М. Было показано, что применение такой технологии не позволяет получить очищенный белок ввиду потерь материала при хроматографической очистке, что видно по снижению пика (поглощение на длине волны 280 нм) при элюции белка раствором, содержащим 250 мМ имидазола (таблица).

Белки семейства CRISPR/CAS обладают достаточно высокими значениями изоэлектрической точки ($pI > 9$), поэтому в растворах, имеющих $pH > pI$ (например, $pH \geq 9,5$), должны иметь отрицательный суммарный заряд. Именно отрицательный суммарный заряд белка семейства CRISPR/CAS должен препятствовать связыванию с заряженными отрицательно бактериальными эндотоксинами разрушенных клеточных стенок бактерий. Данный подход также был реализован для удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков семейства CRISPR/CAS. Для этого дезинтеграцию бактериальных клеток штамма-продуцента проводили при значении $pH = 9,5$, при этом все буферные растворы, используемые на стадии очистки на хроматографическом сорбенте Chelating Sepharose FF, также имели $pH = 9,5$. Было показано, что применение такого метода не позволяет получить высокоочищенный рекомбинантный белок ввиду потерь материала при хроматографической очистке (таблица).

Известно, что хроматографическая очистка на катионообменном сорбенте SP Sepharose FF при низких значениях $pH < 5$ может способствовать удалению бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков. Данный подход был реализован для удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков семейства CRISPR/CAS. На второй стадии очистки на хроматографическом сорбенте SP Sepharose FF все используемые буферные растворы имели $pH = 4$. Было показано, что предложенный подход не позволяет получить очищенный белок ввиду потерь материала при хроматографической очистке (таблица).

Была предпринята попытка удалить бактериальные эндотоксины из растворов рекомбинантных белков системы CRISPR/CAS при помощи специализированного аффинного сорбента Polymyxin B agarose (Sigma-Aldrich, США). Для этого 100 мкл Polymyxin B agarose помещали в раствор рекомбинантного белка семейства CRISPR/CAS и инкубировали в течение 1 часа при постоянном перемешивании при комнатной температуре, после чего сорбент Polymyxin B agarose удаляли центрифугированием. Такой способ финальной доочистки привел к полной преципитации рекомбинантного белка семейства CRISPR/CAS SPCas9 на поверхности аффинного сорбента Polymyxin B agarose (таблица).

Наконец, удаление бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков семейства CRISPR/CAS проводили при помощи детергента Triton X-114, который обладает уникальным свойством — низкой температурой помутнения (23°C), что позволяет использовать его в ряде биохимических приложений, требующих солюбилизации и разделения белков.

Сравнительная характеристика подходов, использованных для удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков, на примере нуклеаз системы CRISPR/CAS

№ п/п	Применённый подход	Этап очистки	Эффект от применения технологии	Содержание бактериальных эндотоксинов
1	Применение буферных растворов с высокой ионной силой	Дезинтеграция бактериальных клеток штамма-продуцента	Резко снижает выход целевого продукта	Не определялось
2	Применение буферных растворов со значением pH, превышающим значение <i>pI</i>	Дезинтеграция бактериальных клеток штамма-продуцента	Резко снижает выход целевого продукта	Не определялось
3	Применение катионообменной хроматографии при значении pH ниже 5	Вторая стадия хроматографической очистки	Резко снижает выход целевого продукта	Не определялось
4	Применение аффинного хроматографического сорбента Polymyxin B agarose	Доочистка готового препарата белка	Приводит к полной преципитации целевого продукта	Не определялось
5	Применение детергента Triton X-114	Доочистка готового препарата белка	Приводит к очистке целевого продукта от бактериальных эндотоксинов	0,3–1,5 ЕЭ/мл

Для удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков семейства CRISPR/CAS при помощи детергента Triton X-114 к раствору белка в буфере добавляли детергент Triton X-114 до конечной концентрации 1% и тщательно перемешивали до видимого помутнения. После этого раствор помещали на ледяную баню на 15 мин. до полного просветления (раствор должен был стать абсолютно прозрачным). Затем раствор помещают в термостат на 37°C на 15 мин. до полного помутнения, что свидетельствует о том, что произошло обогащение раствора мицеллами, содержащими бактериальные эндотоксины. По окончании инкубации разделение водной и мицеллярной фракций осуществляли с помощью центрифугирования при 10 000 g в течение 10 мин. при 23°C. Верхнюю водную фазу отбирали в чистую пробирку. Процедуру очистки для удаления бактериальных эндотоксинов до уровня, позволяющего применять белковый препарат *in vivo*, повторяли 6–9 раз.

Содержание бактериальных эндотоксинов в растворах белков определяли с помощью полуколичественного гель-тромб теста с использованием LAL-реагента с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл (ЛАЛ-Центр, Россия). Данная методика рекомендована Министерством здравоохранения Российской Федерации и описана в Общей Фармакопейной статье ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины».

При применении разработанной технологии удаления бактериальных эндотоксинов из растворов рекомбинантных белков растворы нуклеаз семейства CRISPR/CAS содержали 0,3–1,5 ЕЭ/мл (**таблица**), что в 10–20 раз ниже содержания бактериальных эндотоксинов в препарате коммерчески доступного белка EnGen™ Cas9 NLS, *S. pyogenes* (M0646, NEB, США).

Выводы. Разработана технология, позволяющая получать высокоочищенные рекомбинантные белки с достаточно высокими значениями изоэлектрической точки ($pI > 9$), такие как нуклеазы семейства CRISPR/CAS, содержащие не более 0,3–1,5 ЕЭ/мл, пригодные для применения *in vivo*.

Работа поддержана грантом в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

Литература

1. Xu J., Ge X., Dolan M.C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv.* 2011. Vol. 29 (3). P. 278–99. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.002
2. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/>.



РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОВИРУСНОЙ ДНК ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА (ВИЧ-1), ИНТЕГРИРОВАННОЙ В ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА, В УЛЬТРАНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

М.А. Тюменцева, А.И. Тюменцев, В.Г. Акимкин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Для эффективного функционирования надзорных и мониторинговых служб необходимо внедрение в практику их работы современных молекулярных технологий. Поэтому по-прежнему актуальной остаётся задача разработки новых эффективных методик выявления нуклеиновых кислот возбудителей социально значимых инфекционных заболеваний, например ВИЧ, в том числе основанных на применении систем направленного редактирования генома CRISPR/CAS. В настоящей работе были разработаны направляющие РНК и специфические олигонуклеотиды для предварительной амплификации высоко консервативных участков генома ВИЧ-1. Разработанные направляющие РНК позволяют выявлять единичные копии провирусной ДНК ВИЧ-1 in vitro в составе рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/CAS, в биологических образцах после предварительной амплификации.

Ключевые слова: CRISPR/CAS нуклеаза, направляющая РНК, рибонуклеопротеиновый комплекс CRISPR/CAS, предварительная амплификация, ДНК ВИЧ-1

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-118>

DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR DETECTION OF GENOME-INTEGRATED PROVIRAL DNA OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV-1) IN ULTRA LOW CONCENTRATIONS USING THE CRISPR/CAS SYSTEM

M.A. Tyumentseva, A.I. Tyumentsev, V.G. Akimkin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

For the effective functioning of supervisory and health monitoring services, it is necessary to introduce modern molecular technologies into their practice. Therefore, the task of developing new effective methods for detecting pathogen, for example HIV, based on CRISPR/CAS genome editing systems, remains urgent. In the present work, guide RNAs and specific oligonucleotides were developed for preliminary amplification of highly conserved regions of the HIV-1 genome. The developed guide RNAs make it possible to detect single copies of HIV-1 proviral DNA in vitro as part of CRISPR/CAS ribonucleoprotein complexes in biological samples after preliminary amplification.

Key words: CRISPR/CAS nuclease, guide RNA, ribonucleoprotein complex CRISPR/CAS, preliminary amplification, HIV-1 DNA

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-118>

Введение. Для решения эпидемиологических задач по расшифровке вспышек инфекционных болезней, выявления и идентификации возбудителя необходимы разработка и внедрение в практику работы надзорных и мониторинговых служб современных молекулярных технологий. Одной из таких технологий является использование элементов генетического редактирования системы CRISPR/CAS.

В 2018 г. было показано, что один из ферментов CRISPR системы — CAS12 — после распознавания своей целевой ДНК-мишени начинает неспецифически гидролизовать одноцепочечную, а также двухцепочечную ДНК. Такое свойство CAS12 позволило использовать его в качестве индикатора присутствия определённой мишени, например, генома вируса или бактерии. Исследователи использовали это открытие для создания технологической платформы обнаружения нуклеиновых кислот, известной как DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter — ДНК-нацеленная эндонуклеаза CRISPR трансрепортер). Впервые DETECTR была использована для выявления и генотипирования вируса папилломы человека (HPV). Предложенная платформа объединяет нуклеазу CAS12a, её направляющую РНК, специфичную к нуклеиновой кислоте HPV, флуоресцентную репортерную молекулу. Технология DETECTR используется для обнаружения целевой ДНК-мишени после предварительной амплификации [1].

В связи с этим крайне актуальной является задача разработки новых эффективных методик выявления нуклеиновых кислот возбудителей социально-значимых инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ, основанных на генетических технологиях, таких как CRISPR/CAS.

Цель исследования. Разработка и получение направляющих РНК для выявления единичных копий провирусной ДНК ВИЧ-1.

Материалы и методы. В работе использовались методы амплификации нуклеиновых кислот, в том числе с детекцией флуоресценции в режиме реального времени.

В качестве модельной матрицы провирусной ДНК ВИЧ-1 использовали плазмидную ДНК инфекционного молекулярного клона ВИЧ-1 pNL4-3 [2].

Предварительную амплификацию участков, соответствующих гену вирусной полимеразы POL и длинному концевому повтору LTR, проводили с использованием ПЦР-смеси-2 blue (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и специфических олигонуклеотидов, приведённых в таблице. Размер амплифицированных фрагментов POL и LTR составляет 293 и 480 пары нуклеотидов соответственно. В ходе пробоподготовки для предварительной амплификации проводили титрование модельной матрицы pNL4-3 путём приготовления серийных разведений.

Специфические олигонуклеотиды для предварительной амплификации участков, соответствующих гену вирусной полимеразы (POL) и длинному концевому повтору (LTR)

№ п/п	Наименование	Последовательность, 5'-3'	Мишень
1	ForL	TTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCAGTTG	LTR
2	RevL	TGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTC	LTR
3	Forpol	CACAATTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGG	POL
4	Revpol	CAATCATCACCTGCCATCTGTTTTCCATA	POL

Температурный профиль амплификации для получения ПЦР-продуктов, кодирующих фрагменты генома ВИЧ-1: начальная денатурация 95°C в течение 3 мин.; 30–40 циклов амплификации 95°C — 15 сек., 55°C — 45 сек., 72°C — 30 сек.; финальная элонгация: 72°C в течение 5 мин.

Эффективность предварительной амплификации полученных фрагментов генома ВИЧ-1 оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле.

Предварительно амплифицированный материал без предварительной очистки использовали для экспериментов по выявлению провирусной ДНК ВИЧ-1 с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов AsCpf1 из *Acidaminococcus* и LbCpf1 из *Lachnospiraceae*, содержащих соответствующие направляющие РНК (sgPOL и sgLTR).

Направляющие РНК sgPOL и sgLTR для обнаружения провирусной ДНК ВИЧ-1 были получены, как описано ранее [3]. Создание готового рибонуклеопротеинового комплекса, содержащего белок семейства CRISPR/CAS AsCpf1 из *Acidaminococcus* и/или LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и направляющую РНК, проводили по стандартному протоколу с некоторыми модификациями [3].

Для обнаружения провирусной ДНК ВИЧ-1 с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/CAS готовили реакционную смесь, содержащую 250 нг рибонуклеопротеинового комплекса (AsCpf1 из *Acidaminococcus* и/или LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и направляющие РНК sgPOL и/или sgLTR), 20 pmol флуоресцентного зонда 6FAM-TTATT-BHQ1 и предварительно амплифицированный фрагмент ДНК ВИЧ-1 LTR и/или POL.

Реакционные смеси, содержащие все необходимые компоненты, помещали в амплификатор ДТПрайм 5 (ДНК-Технология, Россия) и задавали следующие параметры реакции: 30–60 циклов; 37°C — 35 сек., 37°C — 25 сек. со съёмкой флуоресценции.

Результаты. Подбор последовательностей-мишеней в геноме вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) для создания направляющих РНК проводили с использованием современных алгоритмов *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей и программ, находящихся в открытом доступе, включая

Benchling [4] и HIV databases [5]. Был составлен перечень участков генома ВИЧ-1 с теоретически рассчитанной вероятностью их расщепления в высоко консервативных участках генома. Из составленного перечня были выбраны участки, соответствующие гену вирусной полимеразы (POL) и длинному концевому повтору (LTR), и сконструированы соответствующие направляющие РНК.

Для обнаружения провирусной ДНК ВИЧ-1 с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/CAS был проведён ряд экспериментов и показано, что комплексы, сформированные на основе AsCpf1 из *Acidaminococcus* и LbCpf1 из *Lachnospiraceae* и соответствующих направляющих РНК, обладают способностью выявлять до 1 фг ДНК ВИЧ-1 (что соответствует 65 копиям ДНК, внесённым в реакцию предварительной амплификации) на 30-м цикле (30 мин.) анализа. Рибонуклеопротеиновые комплексы CRISPR/CAS способны обнаруживать до 10 фг ДНК ВИЧ-1 (что соответствует 650 копиям ДНК, внесённым в реакцию предварительной амплификации) при 25°C и 42°C. Оптимальной температурой для проведения анализа является 37°C, поскольку рибонуклеопротеиновые комплексы CRISPR/CAS способны обнаруживать до 1 фг ДНК ВИЧ-1 и значение сигнала превышает значение «шума» более чем в 2,5 раза.

Кроме того, было показано, что увеличение количества вносимой в реакцию мишени, как и комбинирование мишеней, вносимых в реакцию, не приводит к существенным изменениям значений флуоресценции в образце с минимальным количеством анализируемого материала (1 фг ДНК ВИЧ-1).

Для обнаружения единичных копий провирусной ДНК ВИЧ-1 с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/CAS был оптимизирован процесс предварительной амплификации за счёт увеличения количества циклов. В ходе проведённого анализа было показано, что рибонуклеопротеиновые комплексы CRISPR/CAS обладают способностью выявлять единичные копии ДНК ВИЧ-1, причем увеличение количества циклов предварительной амплификации до 35–40 позволяет обнаруживать до 2 аг ДНК ВИЧ-1 (2×10^{-18} г, что соответствует 1,3 копиям ДНК, внесённым в реакцию предварительной амплификации). При этом уже на 10–15-м цикле (10–15 мин.) анализа значение сигнала превышало значение «шума» вдвое, а к 60-му циклу анализа — более чем в 3–10 раз, при внесении в анализ материала, предварительно амплифицированного в течение 35 циклов.

Выводы. Разработаны направляющие РНК, позволяющие выявлять единичные копии провирусной ДНК ВИЧ-1 *in vitro* в составе рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/CAS, в биологических образцах после предварительной амплификации.

Работа поддержана грантом в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

Литература

1. Chen J., Ma E., Harrington L., Da Costa M., Tian X., Palefsky J., Doudna J. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018. Vol. 360. P. 436–439.
2. HIV-1 NL4-3 Infectious Molecular Clone (pNL4-3) https://aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=molecular_clones&id=633
3. Акимкин В.Г., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А. Система CRISPR-CAS для детекции провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека, интегрированной в геном человека, в ультранизких концентрациях. Патент РФ № 2720768. 2019. Бюл. № 14.
4. Benchling <https://www.benchling.com/molecular-biology/>
5. HIV Sequence Database <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО И НИЗКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.Б. Файзулов, А.Н. Каира, Т.Р. Узбеков, А.А. Поромов, Е.А. Волынская,
О.А. Свитич, В.В. Зверев

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

Ключевые слова: вирус папилломы человека (ВПЧ), генотипирование ВПЧ, ВПЧ высокого риска, ВПЧ низкого риска

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-123>

GENETIC STRUCTURE OF HIGH AND LOW RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUSES CIRCULATING IN THE RUSSIAN FEDERATION

E.B. Faizuloev, A.N. Kaira, T.R. Uzbekov, A.A. Poromov, E.A. Volynskaya, O.A. Svitich,
V.V. Zverev

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

Key words: human papillomavirus (HPV), HPV genotyping, high-risk HPV, low-risk HPV

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-123>

Введение. Среди более чем 200 известных генотипов вируса папилломы человека (ВПЧ) наибольшую клиническую значимость имеют представители рода *Alphapapillomavirus*, среди которых выделяют ВПЧ высокого риска (ВПЧ-ВР) и низкого риска (ВПЧ-НР) по степени их канцерогенности.

Цель исследования. Оценка распространённости ВПЧ-ВР и ВПЧ-НР на территории России.

Материалы и методы. Биологические образцы (урогенитальные соскобы) получены в течение 2019 г. от пациентов разного пола и возраста, проживающих в разных федеральных округах РФ (всех, кроме Дальневосточного ФО), обратившихся в медицинские центры по поводу подозрения на ВПЧ-инфекцию органов мочеполовой системы ($n = 12945$). Генотипирование ВПЧ проводили в лаборатории ООО «Диалаб-Плюс» (г. Москва) при помощи набора реагентов «Квант-21» (ДНК-Технология, Россия), позволяющего выявлять ВПЧ-ВР (31, 35, 52, 33, 68, 45, 82, 51, 39, 58, 66, 26, 53, 59, 56, 73, 16, 18 генотипов) и ВПЧ-НР (6, 11 и 44 генотипов).

Результаты. При обследовании образцов 12945 пациентов ВПЧ выделен у 5013 лиц (моноинфекция — у 3057 пациентов, смешанная инфекция — у 1956 пациентов). Рассчитаны средние значения и доверительный интервал (ДИ) частоты выявления каждого генотипа. Установлено, что на территории РФ

доминирующими являются ВПЧ 16 — 13,8% (95% ДИ 13,0–14,5), ВПЧ 6 — 10,7% (10,0–11,3), ВПЧ 51 — 6,8% (6,3–7,3), ВПЧ 44 — 6,8% (6,2–7,3), ВПЧ 53 — 6,3% (5,8–6,8), ВПЧ 31 — 5,6% (5,2–6,2), ВПЧ 56 — 5,5% (5,0–6,0), ВПЧ 52 — 5,4% (5,0–5,9), ВПЧ 66 — 4,7% (4,3–5,2), ВПЧ 18 — 4,4% (4,0–4,9), ВПЧ33 — 4,4% (3,9–4,8), ВПЧ 68 — 4,4% (3,9–4,8), ВПЧ 39 — 3,6% (3,2–4,0), ВПЧ 73 — 3,2% (2,8–3,6), ВПЧ 45 — 3,0% (2,7–3,4), ВПЧ 58 — 3,0% (2,6–3,3), ВПЧ 59 — 2,4% (2,1–2,8), ВПЧ 35 — 2,4% (2,0–2,7), ВПЧ 82 — 2,1% (1,8–2,4), ВПЧ 11 — 1,2% (1,0–1,5), ВПЧ 26 — 0,3% (0,2–0,5). Наиболее часто к врачу с ВПЧ-инфекцией обращаются лица в возрасте 20–39 лет, причём женщины в 8,5 раз чаще, чем мужчины. Выявлена тенденция более частого выявления у мужчин штаммов ВПЧ-НР (ВПЧ 6, 11), тогда как у женщин чаще выявляли ВПЧ-ВР (ВПЧ 16, 33, 45).

Выводы. Проведённый мониторинг циркулирующих штаммов ВПЧ разных типов позволит прогнозировать эффективность на территории РФ ВПЧ-вакцин различного состава, а также представляет интерес при разработке отечественной ВПЧ-вакцины.

COVID-19: ЛАБОРАТОРНЫЕ, КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ, НАПРАВЛЕННОГО НА ПРОФИЛАКТИКУ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРОСА МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ И ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ

В.В. Беляева¹, Н.В. Козырина¹, У.А. Куимова¹, М.Д. Голиусова¹, А.Н. Наркевич²

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, профилактика, поведение

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-125>

BEHAVIOURAL PATTERNS FOR PROPHYLAXIS OF COVID-19: SURVEY OF MEDICAL PROFESSIONALS AND AIDS PATIENTS

V.V. Belyaeva¹, N.V. Kozyrina¹, U.A. Kuimova¹, M.D. Goliusova¹, A.N. Narkevich²

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²Prof. V.F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russia

Key words: new coronavirus infection, COVID-19, prevention, behavior

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-125>

Цель исследования. Изучить особенности поведения целевых групп, направленного на профилактику инфицирования новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

Материалы и методы. В период с 21.05.2020 г. по 15.06.2020 г. опрошено 192 респондента. Группу I составили 67 медицинских работников, группу II — 79 пациентов, инфицированных ВИЧ, группу III — 46 респондентов группы сравнения.

Доля женщин в группе I составила 78%, мужчин 22%. Большинство опрошенных группы I имели высшее образование (76%), среднее и среднее специальное образование — 24%, медиана возраста — 43 года. В практическом здравоохранении работали 97% специалистов; из них врачей-инфекционистов — 13%. 5 человек (8%) перенесли COVID-19.

В группе II доля мужчин — 68%, женщин — 32%, медиана возраста — 38 лет, 63% имели высшее или неполное высшее образование. Медиана жизни с ВИЧ-инфекцией — 10 лет, 98% опрошенных имели опыт лечения ВИЧ-инфекции. 2 респондента перенесли COVID-19.

В группе III доля женщин составила 67%, мужчин — 33%, медиана возраста — 38,0 лет. Доля лиц с высшим и незаконченным высшим образованием — 85%, лиц со средним и средним специальным образованием — 15%.

Респондентам задавали открытый вопрос: «Какие способы защиты от коронавируса вы используете?»

Статистическая значимость различий оценивалась с помощью критерия χ^2 Пирсона и точного критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Респонденты I, II и III групп использовали соответственно:

- средства индивидуальной защиты (СИЗ) — 93%, 86% и 72% ($p_{1-3} = 0,007$);
- соблюдение гигиены (без дополнительных указаний) (БДУ) назвали 40%, 34% и 57% ($p_{2-3} = 0,015$);
- средства дезинфекции — 52%, 49%, 54%;
- воздерживались от посещения общественных мест 16%, 5% и 35% ($p_{1-2} = 0,048$; $p_{1-3} = 0,025$; $p_{2-3} < 0,001$);
- соблюдение социальной дистанции — 25%, 15%, 57% ($p_{1-3} = 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$);
- соблюдали режим самоизоляции — 9%, 17%, 39% ($p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} = 0,005$).

Выводы. Использование СИЗ наиболее популярно во всех обследованных группах. ВИЧ-инфицированные пациенты по сравнению с остальными группами достоверно меньше соблюдали социальную дистанцию и ограничения посещения людных мест. Нарушение режима самоизоляции в группе медицинских работников, вероятно, связано с профессиональной деятельностью. Результаты данного исследования могут быть использованы при консультировании населения по вопросам профилактики COVID-19.



ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ COVID-19 НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

С.А. Бугоркова, Е.А. Чумачкова, А.Л. Кравцов, С.А. Портенко, В.А. Кожевников,
А.Ю. Гончарова, Е.В. Найденова, О.В. Кедрова, Е.С. Казакова, С.А. Щербакова

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Ключевые слова: клеточный иммунитет, цитокины, SARS-CoV-2, внебольничная пневмония

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-127>

IMMUNOLOGICAL DISORDERS IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA DURING THE COVID-19 EPIDEMIC IN SARATOV OBLAST

S.A. Bugorkova, E.A. Chumachkova, A.L. Kravtsov, S.A. Portenko, V.A. Kozhevnikov,
A.Yu. Goncharova, E.V. Naidenova, O.V. Kedrova, E.S. Kazakova, S.A. Shcherbakova

Russian Research Antiplague Institute Microbe, Saratov, Russia

Key words: cellular immunity, cytokines, SARS-CoV-2, community-acquired pneumonia

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-127>

Введение. В период эпидемии COVID-19 на территории Саратовской области зарегистрирован резкий подъём заболеваемости внебольничной пневмонией (ВП). Обращает на себя внимание увеличение числа случаев заболевания с тяжёлым и среднетяжёлым течением болезни. Среди причин тяжёлого течения ВП отмечается скудность базовых клинико-лабораторных и рентгенологических данных, особенно в начальный период болезни. Лишь в 14% случаев ВП правильный диагноз устанавливается в первые трое суток болезни [1]. В настоящее время остаётся ряд вопросов относительно иммунологических особенностей течения ВП, обусловленных SARS-CoV-2, связанных с поиском предикторов тяжести течения новой коронавирусной инфекции. В этой связи целью исследования было выявление у пациентов с ВП иммунологических особенностей течения заболевания в период эпидемии COVID-19.

Цель исследования. Выявление у пациентов с ВП иммунологических особенностей течения заболевания в период эпидемии COVID-19. Исследование проведено на территории Саратовской области с июля по август 2020 г. Обследовано 38 пациентов с ВП в возрасте от 17 до 92 лет (60 (51; 71)). Выполнен цитометрический анализ клеточного звена иммунной системы и исследованы уровни цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-17). Статистический анализ проведен с помощью программы «Statistica 10». Установлены прогностические показатели тяжести течения ВП в первые 2 недели заболевания (низкое количество лимфоцитов, снижение доли

Т-цитотоксических клеток и повышение доли натуральных киллеров на фоне, снижение резервных возможностей клеток по продукции IFN- γ и TNF- α) и после 17-го дня болезни (сохраняющееся падение количества лимфоцитов и Т-хелперов, увеличение количества гранулоцитов на фоне резкого повышения их функциональной активности, уменьшение резервных возможностей клеток по продукции IFN- γ и IL-17). Для больных COVID-19 зафиксирован факт повышения доли нейтрофилов в общей популяции гранулоцитов на фоне резкого повышения их функциональной активности. Таким образом, для ВП, обусловленной SARS-CoV-2, характерно более выраженное истощение Т-клеточного звена иммунитета и снижение функциональных резервов клеток по продукции цитокинов, ассоциированных с Th1 ответом.

Материалы и методы. Исследование проведено на территории Саратовской области с июля по август 2020 г. Обследовано 38 пациентов с ВП в возрасте от 17 до 92 лет (60 (51; 71)): 5 пациентов (13,25%) с лёгким течением, 3 (7,9%) с тяжёлым и 30 больных с заболеванием средней тяжести. У 10 пациентов (26%) был отрицательный результат ПЦР исследования мазка из зева и носа на SARS-CoV-2 и при обследовании в динамике не выявлены специфические антитела классов IgM и/или IgG к вирусу. В первые 2 недели болезни обследовано 13 пациентов (34%), после 2-й недели — 25 (66%). Проведён цитофлуориметрический анализ популяционного и субпопуляционного состава лейкоцитов крови по показателям светорассеяния и с помощью моноклональных антител (Beckman Coulter, США) для определения относительного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток. Нейтрофилы идентифицировали в суммарной гранулоцитарной популяции как клетки, экспрессирующие специфический рецептор Fc γ RIIIB (CD16), являющийся триггером некроза. Степень их функциональной активации формируемыми в крови иммунными комплексами оценивали по снижению экспрессии молекулы Fc γ RIIIB на клетку, а также по степени дегрануляции в условных единицах интенсивности бокового светорассеяния. Повреждённые лейкоциты (в апоптозе и некрозе) идентифицировали и подсчитывали на цитограммах как клетки с пониженной экспрессией CD45 (CD45^{dim}). В ИФА выполнено исследование уровня цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-17) с помощью наборов (ЗАО «Вектор-Бест», Россия и BD Biosciences, США). Функциональные резервы клеток оценивали в пробах *in vitro* после индукции специфическим Т-клеточным митогеном Конканавалин А (Sigma, США). Статистический анализ проведен с помощью программы «Statistica 10».

Результаты. В первые 2 недели заболевания прогностическими показателями тяжести течения болезни были: низкое количество лимфоцитов

(27,4 (9,6–48,8)), снижение доли Т-цитотоксических клеток (19,5 (15–33,1)) и повышение доли натуральных киллеров (13,2 (6,9–19,2)) на фоне снижения резервных возможностей клеток по продукции IFN- γ (64,3 (10,5–967,1)) и TNF- α (23,6 (9,24–284,3)). Через 2 недели от начала болезни прогностическими показателями тяжести течения заболевания были: сохраняющееся падение количества лимфоцитов и Т-хелперов (24,6 (11,4–41,9)), увеличение количества гранулоцитов (67,4 (53,2–74,2)) на фоне резкого повышения функциональной активности нейтрофилов (интенсивная дегрануляция и сниженная экспрессия рецептора Fc γ RIII137.7 (107,8–160,4) и уменьшение резервных возможностей клеток по продукции IFN- γ (20,7 (8,4–44,2)), IL-17 (37,4 (8–93,6)).

Представляла интерес попытка выявить значимые отличия в реакции иммунной системы больных ВП с установленным диагнозом COVID-19 по сравнению с пациентами с невыявленным этиологическим агентом воспаления. Результаты анализа иммунологических показателей представлены в таблице.

По ключевым маркерам не установлено достоверного отличия между иммунологическими показателями, характерными для ВП, обусловленной SARS-CoV-2, и ВП иной вирусной этиологии.

Общие закономерности реакции иммунной системы у больных с подтвержденным (ПЦР) диагнозом COVID-19 по частоте выявления отклонения от показателя нижней границы нормы распределились: снижение общего пула лимфоцитов (45%), снижение доли гранулоцитов (40%), снижение доли Т-клеток (35%), снижение доли В-клеток (85%), снижение доли Т-хелперов (60%), снижение доли Т-цитотоксических клеток (50%), снижение доли натуральных киллеров (45%), в 100% случаев было зарегистрировано повышение доли нейтрофилов в общей популяции гранулоцитов с существенным повышением их функциональной активности по исследуемым показателям, повышение доли поврежденных клеток (50%) и снижение резервных возможностей клеток по продукции TNF- α и IFN- γ (100% и 90% соответственно).

Полученные нами данные относительно снижения общего количества лимфоцитов, В-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток и натуральных киллеров у пациентов с ВП, обусловленной SARS-CoV-2, согласуются с результатами исследований в Ухани [2]. На наш взгляд, особого внимания заслуживает факт повышения доли нейтрофилов в общей популяции гранулоцитов на фоне резкого повышения их функциональной активности по исследуемым показателям и снижение резервных возможностей клеток по продукции TNF- α .

Выводы. 1. Оценка состояния популяции гранулоцитов, Т- и В-клеток, Т-хелперов является наиболее информативной для характеристики корона-вирусной пневмонии.

Иммунологические показатели у пациентов с ВП Ме (Q25%–Q75%)

Показатель (условная норма)	Пациенты с коронавирусной пневмонией (n = 28)	Пациенты с пневмонией иной этиологии (n = 10)
Лимфоциты (19–37%)	27,4 (16,3–48,4)	21,1 (10,2–29,8)
Гранулоциты (50–70%)	53,2 (44,4–68,1)	72,9 (60,6–76,5)
Т-клетки (55–85%)	61,2 (53,7–75,7)	72,1 (60–77,9)
В-клетки (6–20%)	3,8 (2,7–5,6)	4,1 (2,3–6,3)
Т-хелперы (31–46%)	26,5 (20,6–32,1)	30,5 (24,8–39,5)
Т-цитотоксические клетки (23–40%)	33,7 (20,1–41,4)	21,4 (18,9–39,4)
NK клетки (10–15%)	10,5 (8,9–15,6)	12 (5,7–14,1)
Доля нейтрофилов в общей популяции гранулоцитов (47–72%)	95,2 (89–98,3)	94,4 (93–97,2)
Экспрессия FcγRIIIB (CD16) на нейтрофилах (276,3–303,6 у.е.)	138,9 (116,5–158,4)	114,1 (96–151,3)
Содержание гранул в нейтрофилах (6043 (5858–6356))	2689 (2592–2871)*	2919 (2784–3042)
Доля повреждённых клеток (менее 5%)	9,9 (6,8–15,5)	8,6 (5,6–11,2)
Спонтанная продукция IFN-γ (0–14 пг/мл)	0,5 (0–2,2)	3,5 (0,3–4,9)
Индукцированная продукция IFN-γ (165–7450 пг/мл)	120,4 (22,4–311,4)	91,1 (58,8–612,1)
Спонтанная продукция TNF-α (1–42 пг/мл)	2,6 (1,3–16,9)	2,5 (1,3–4,2)
Индукцированная продукция TNF-α (391–2700 пг/мл)	58,8 (9,5–232,1)	47,3 (15,8–159,4)
Спонтанная продукция IL-17 (1–10 пг/мл)	0	0
Индукцированная продукция IL-17 (70–1500 пг/мл)	129,6 (53,9–274,1)	152,1 (78,9–185,9)

* Достоверность отличия между группами $p < 0,05$

2. Иммунологическая характеристика ВП средней степени тяжести при COVID-19, хотя и имеет ряд особенностей, но принципиально не отличается по реакции иммунной системы от обычной вирусной пневмонии.

3. Для ВП, обусловленной SARS-CoV-2, характерно более выраженное истощение Т-клеточного звена иммунитета, проявляющееся в резком снижении функциональных резервов клеток по продукции цитокинов, ассоциированных Th1 ответом.

Литература

1. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Тюрина Е.Б., Хайруллина Р.М., Бикметова Н.Р. Особенности иммунных нарушений при внебольничных пневмониях. *Медицинская иммунология*. 2007. № 9(6). С. 605–612.
2. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L. et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19. *Pneumonia Journal of Infectious Diseases*. 2020. Vol. 221(11). P. 1762–1769. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa150>



НАБОР РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК SARS-COV-2

Е.А. Гончарова¹, А.С. Долгова¹, И.С. Кассиров¹, А.П. Луч¹, В.Г. Дедков^{1,2}

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

²Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, молекулярная диагностика

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-131>

ONE-STEP QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR RNA SARS-COV-2 DETECTION

Е.А. Goncharova¹, А.С. Dolgova¹, I.S. Kassirov¹, А.Р. Luch¹, V.G. Dedkov^{1,2}

¹Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia;

²Sechenov University, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Moscow, Russia

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, molecular diagnostics

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-131>

Введение. Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, является актуальной проблемой мирового уровня. Точная диагностика SARS-CoV-2 необходима для своевременного оказания медицинской помощи и изоляции пациентов с целью предотвращения дальнейшего распространения вируса.

Цель исследования. Разработка набора реагентов (COVID-Amp) на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-РВ-ПЦР) для диагностики генетических маркёров SARS-CoV-2 в биологических образцах пациентов с подозрением на COVID-19.

Материалы и методы. В качестве мишени был выбран фрагмент РНК-зависимой РНК-полимеразы. Температуры плавления праймеров рассчитывали с использованием Oligonucleotide Properties Calculator. Анализ термодинамических характеристик и вторичной структуры зондов проводился с помощью Mfold. Зонды были модифицированы путём присоединения флуорофоров родамин 6 G (R6G, для специфического зонда) и FAM (для зонда внутреннего контроля) на 5'-конец, а также гасителя BHQ1 на 3'-конец. Контрольные образцы представляли собой 2 плазмиды, содержащие специфический участок кДНК вируса и внутреннего контроля, а также 2 MS2 фага, содержащие специфический участок РНК вируса (MS2-B) и внутреннего контроля

(MS2-K). Чувствительность набора реагентов определяли с помощью проведения ОТ-РВ-ПЦР на серийных десятикратных разведениях MS2-B и MS2-K. Специфичность праймеров и зонда на SARS-CoV-2 была показана на панели нуклеиновых кислот респираторных вирусов. Для проведения ОТ-РВ-ПЦР были отобраны образцы 109 пациентов (43 мужчин, 66 женщин), средний возраст — 49 лет (от 21 до 88), с симптомами COVID-19. Образцы были проанализированы с помощью COVID-Amp и системы детекции РНК SARS-CoV-2 по рекомендациям ВОЗ.

Результаты. Чувствительность COVID-Amp составила 10^3 копий/мл, специфичность — 100%. При анализе биологических образцов с помощью COVID-Amp и по протоколу ВОЗ были обнаружены 9 дискордантных образцов (отрицательные по протоколу ВОЗ и положительные при применении COVID-Amp), которые были дополнительно проверены на системе Вектор-ПЦРv-2019-nCoV-RG и детектированы как положительные.

Выводы. Разработанный набор реагентов для выявления генетических маркёров вируса SARS-CoV-2 может применяться для диагностики COVID-19 в биологическом материале.



ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ COVID-19 В ПЕРИОД С 10 МАРТА ПО 17 АВГУСТА 2020 г.

Д.В. Дубоделов, В.В. Клушкина, Н.С. Чурилова, Я.В. Панасюк,
Н.В. Власенко, С.Н. Кузин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Изучены отдельные параметры эпидемического процесса COVID-19 в Краснодарском крае за период с 10 марта по 17 августа 2020 г. Показано сохранение высокого уровня заболеваемости с COVID-19 после отмены ограничительных мероприятий — в среднем в завершающую фазу периода наблюдения регистрировали 83 пациента в день. Удельный вес пациентов, перенёсших заболевание в тяжёлой и среднетяжёлой форме, составляет 63,7%, причём у лиц в возрасте старше 65 лет их доля несколько выше — 76,0%. Наиболее интенсивно в эпидемический процесс вовлечены пенсионеры, временно не работающие (мужчины и женщины) и работники медицинских организаций (женщины).

Ключевые слова: COVID-19, SARS-COV-2, мониторинг

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-133>

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COVID-19 INCIDENCE IN THE POPULATION OF KRASNODAR KRAI IN THE PERIOD FROM MARCH 10 TO AUGUST 17, 2020

D.V. Dubodelov, V.V. Klushkina, N.S. Churilova, Ia.V. Panasiuk, N.V. Vlasenko, S.N. Kuzin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

We studied individual parameters of the COVID-19 epidemic process in the Krasnodar Territory for the period from March 10 to August 17, 2020. It is shown that a high level of morbidity remains after the abolition of restrictive measures — on average, 83 patients with COVID-19 were registered per day in the final phase of the observation period. The proportion of patients with severe and moderate disease is 63.7%, and in persons over the age of 65, their proportion is slightly higher — 76.0%. The most intensively involved in the epidemic process are pensioners, temporarily unemployed (men and women) and workers of medical organizations (women).

Key words: COVID-19, SARS-COV-2, monitoring

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-133>

Введение. Динамика регистрации новых случаев заболевания, вызываемого новым вирусом SARS-COV-2, в разных регионах страны имеет существенные различия [1, 2]. Существует ряд территорий, на которых, несмотря на проведение комплекса ограничительных мероприятий, количество ежедневно регистрируемых новых, лабораторно подтверждённых, случаев остаётся стабильно высоким. К таким регионам относится Краснодарский край.

С 15 марта 2020 г. на территории края введён режим повышенной готовности, приостановлено проведение досуговых, развлекательных, зрелищных, культурных, физкультурных, спортивных, выставочных, просветительских, рекламных, деловых, социально ориентированных и иных подобных мероприятий с очным присутствием граждан, приостановлена деятельность ряда предприятий и организаций. С 31 марта введён режим самоизоляции. С 13 апреля начата реализация образовательных программ с применением электронного обучения и дистанционных образовательных технологий. Первый этап снятия ограничений начался 27 июня 2020 г. Однако по состоянию на 17 августа в Краснодарском крае продолжал сохраняться стабильно высокий уровень регистрации новых случаев заболевания COVID-19.

Цель исследования. Изучить динамику регистрации новых случаев COVID-19 в Краснодарском крае в период с 10 марта по 17 августа 2020 г. Дать характеристику основным периодам регистрации новых случаев заболевания, описать вовлечённость отдельных категорий населения в эпидемический процесс.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ лабораторно подтверждённых случаев заболевания COVID-19 среди населения Краснодарского края за период с 10 марта по 17 августа 2020 г. Расчёт показателей описательной статистики производился с использованием пакета анализа MS Excel, при расчёте коэффициента корреляции использован коэффициент Пирсона.

Результаты. Всего за период с 10 марта по 17 августа на территории Краснодарского края зарегистрировано 10 153 лабораторно подтверждённых случая заболевания COVID-19, из которых 49 случаев приходится на иностранных граждан.

Доля женщин среди заболевших составила 59,3%, доля мужчин — 40,7%. Средний возраст заболевших женщин равнялся 49,1 лет со стандартным отклонением (далее σ) равным 19,7 и модой (далее МО) — 60 лет, средний возраст мужчин — 46,5 лет, $\sigma = 20,1$, МО = 60.

При анализе распределения количества заболевших женщин по возрасту установлено, что всех заболевших можно условно разделить на несколько групп. В группе женщин моложе 19 лет отсутствует корреляция количества выявляемых случаев с возрастом. В группах с 19 до 60 лет и с 78 до 82 лет выявлена положительная корреляция количества заболевших с возрастом ($r = 0,93$, $r = 0,83$ соответственно). В группах женщин с 61 до 77 и старше 82 лет выявлена обратная зависимость количества заболевших с возрастом ($r = -0,92$ и $r = -0,88$ соответственно).

Заболевших мужчин можно условно разделить на несколько групп. В группах мужчин моложе 19 лет и с 34 до 53 лет количество заболевших не имеет корреляции с возрастом. В группах с 19 до 33 лет, с 54 до 60 и с 76 до 80 лет

выявлена прямая корреляция количества заболевших с возрастом ($r = 0,91$, $r = 0,77$ и $r = 0,82$ соответственно). В группе мужчин в возрасте от 61 до 75 лет и старше 80 лет выявлена обратная зависимость количества заболевших от возраста ($r = -0,93$ и $r = -0,85$ соответственно).

Доля лиц, перенёсших заболевание в тяжёлой и среднетяжёлой форме, составляет 63,7%, зависимости тяжести заболевания от пола выявить не удалось. Анализ долей тяжёлых и среднетяжёлых форм заболевания у женщин и мужчин показал, что в группе моложе 10 лет наблюдается обратная корреляция количества тяжёлых и среднетяжёлых форм и возраста ($r = -0,92$), средняя доля тяжёлых и среднетяжёлых форм в этой группе составила 40,0%. В возрастной группе от 10 до 65 лет наблюдается прямая корреляция между количеством тяжёлых и среднетяжёлых форм и возрастом ($r = 0,92$), средняя доля тяжёлых и среднетяжёлых форм в этой группе составила 57,5%. В возрастной группе старше 65 лет корреляция между возрастом и долей тяжёлых и среднетяжёлых форм отсутствует, средняя доля таких форм составила 76,0%.

Среди заболевших женщин доля госпитализированных составила 67,4% ($N = 6024$), среди мужчин — 69,9% ($N = 4129$). У женщин в возрастной группе младше 19 лет средняя частота госпитализации составила 57%, в возрастной группе от 19 до 80 лет — 67,5%, в возрастной группе старше 80 лет — 85,3%. У мужчин в возрастной группе моложе 19 лет средняя частота госпитализации составила 51,3%, в возрастной группе от 19 до 80 лет — 71,6%, в возрастной группе старше 80 лет — 89,4%.

Распределение заболевших по характеру трудовой деятельности удалось оценить для 9238 заболевших (в группу не вошли дети и лица с отсутствующими сведениями о характере трудовой деятельности). Среди женщин ($N = 5587$) наибольшее количество заболевших зарегистрировано в группах: пенсионеры — 29,4%, работники медицинских организаций — 23,8%, временно не работающие — 19,9%, служащие — 16,8%. Среди мужчин ($N = 3651$) наибольшее количество заболевших зарегистрировано в группах: пенсионеры — 26,8%, временно не работающие — 24,0%, служащие — 20,5%. Периодизация регистрации новых случаев заболевания представлена в таблице.

Первый лабораторно подтверждённый случай заболевания зарегистрирован 10 марта. Среди 27 заболевших, выявленных в период регистрации единичных случаев, 26 прибыли из зарубежных государств (Армения, Великобритания, Германия, Грузия, Иран, Испания, Италия, Мексика, Нидерланды, Объединённые Арабские Эмираты, Румыния, США, Турция, Франция, Чешская Республика, Швейцария) не более чем за 2 недели до изоляции, средний возраст заболевших составил 39,4 лет. Госпитализированы 26 человек. В среднем в этот период в сутки регистрировались 1,3 новых случая заболевания. Заболевшие

Периоды регистрации новых случаев

Название	Дата начала– дата окончания	Длительность (дней)	Количество заболевших (<i>N</i>), среднее количество заболевших в день (<i>M</i>), стандартное отклонение (σ)
Период регистрации единичных случаев	10.03–29.03.2020	20	$N = 27, M = 1,35, \sigma = 1,5$
Период регистрации множественных случаев	30.03–7.04.2020	9	$N = 74, M = 8,22, \sigma = 4,8$
Период выраженного эпидемического подъёма	8.04–27.04.2020	20	$N = 810, M = 40,5,$ $\sigma = 21,3$
Период стабильно высокой заболеваемости	28.04–17.08.2020	112	$N = 9242, M = 82,5,$ $\sigma = 15,8$

относились к следующим социальным группам: временно не работающие, служащие, пенсионеры, рабочие. Основную долю заболевших составляли временно не работающие — 51,9%.

В период с 30 марта по 7 апреля (период регистрации множественных случаев) зарегистрировано 74 новых случая заболевания. В сутки в среднем регистрировалось 8,2 новых случая. В эпидемический процесс в этот период произошло вовлечение детей, студентов и работников медицинских организаций. Основную долю заболевших составляли: временно не работающие — 52,7%, дети — 18,9% и пенсионеры — 12,2%. Все выявленные заболевшие были госпитализированы, 37,8% прибыли из-за рубежа не более чем за 2 недели до изоляции. Средний возраст заболевших составил 37,7 лет.

В период с 8 по 27 апреля (период выраженного эпидемического подъёма) зарегистрировано 810 новых случаев заболевания. В сутки в среднем регистрировалось 40,5 новых случаев. Средний возраст заболевших составил 48,3 лет. Произошло вовлечение в эпидемический процесс работников сельского хозяйства. Основную долю заболевших составляли: служащие — 27,3%, пенсионеры — 25,6%, временно не работающие — 17,2%. Госпитализировано 80,5% заболевших. По степени тяжести случаи распределились следующим образом ($N = 605$): бессимптомные формы — 23,6%, лёгкие — 13,1%, средней тяжести — 57,0%, тяжёлые — 6,3%.

В период с 28 апреля по 17 августа (период стабильно высокой заболеваемости) зарегистрировано 9242 заболевших, в среднем в день регистрировалось 82,5 новых случая. Эпидемический процесс распространился на все социальные группы населения. Средний возраст заболевших составил 48,1 лет. Основную

долю заболевших составляли: пенсионеры — 26,0%, временно не работающие — 19,5%, работники медицинских организаций — 17,1%, служащие — 15,8%. Госпитализировано 67,0% заболевших. По степени тяжести случаи распределились следующим образом ($N = 9145$): бессимптомные формы — 23,2%, лёгкие — 13,0%, средней тяжести — 61,8%, тяжёлые — 2,0%.

Выводы. 1. По состоянию на 17 августа в Краснодарском крае продолжал регистрироваться стабильно высокий уровень выявления новых случаев COVID-19. В среднем в этот период в день регистрировалось 83 новых, лабораторно подтверждённых случая.

2. В группах женщин с 19 до 60 лет и с 78 до 82 лет, а также мужчин с 19 до 33 лет, с 54 до 60 лет и с 76 до 80 лет выявлена положительная корреляция количества заболевших с возрастом.

3. Доля лиц, перенёвших заболевание в тяжёлой и среднетяжёлой форме, составляет 63,7%. В возрастной группе моложе 10 лет доля таких форм составила 40,0%, в возрасте от 10 до 65 лет — 57,5%, в возрасте старше 65 лет — 76,0%.

4. Наибольшая вовлечённость в эпидемический процесс среди женщин выявлена в группах пенсионеров, работников медицинских организаций и временно не работающих. Среди мужчин — в группах пенсионеров, временно не работающих и служащих.

Литература

1. Оперативные данные. Правительство Российской Федерации. <https://xn--80aesfpebagmfbcl0a.xn--p1ai/information/>
2. Карта распространения коронавируса в Российской Федерации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. <https://covid19.rosminzdrav.ru/>
3. Постановление главы администрации (губернатора) Краснодарского края от 13 марта 2020 г. № 129 «О введении режима повышенной готовности на территории Краснодарского края и мерах по предотвращению распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-2019)»



ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА COVID-19 В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ В ПЕРИОД С 19 МАРТА ПО 12 АВГУСТА 2020 г.

**Д.В. Дубоделов, В.В. Клушкина, Н.С. Чурилова, Я.В. Панасюк, Н.В. Власенко,
С.Н. Кузин**

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Изучена эпидемиологическая ситуация по COVID-19 в Ставропольском крае РФ в период с 19 марта по 12 августа 2020 г. Выявлено отсутствие значительного снижения числа новых случаев после завершения фазы подъёма заболеваемости COVID-19. Среднее число зарегистрированных пациентов COVID-19 в заключительной фазе периода наблюдения составило 93 в день. Показано, что частота тяжёлых форм COVID-19 выше у пациентов старших возрастных групп: в группе 80 лет и старше частота среднетяжёлых и тяжёлых форм COVID-19 составила 69,4%, тогда как в группе до 27 лет — 23,6%. Выявлена положительная корреляция количества заболевших COVID-19 с возрастом для возрастных групп 20–41, 54–60 и 77–83 года (женщины) и 21–36 и 57–59 лет (мужчины).

Ключевые слова: COVID-19, SARS-COV-2, мониторинг

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-138>

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COVID-19 CASES IN THE STAVROPOL KRAI DURING MARCH 19, 2020 TO AUGUST 12, 2020

D.V. Dubodelov, V.V. Klushkina, N.S. Churilova, Ia.V. Panasiuk, N.V. Vlasenko, S.N. Kuzin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

We studied the epidemiological situation of the COVID-19 epidemic in the Stavropol Territory during March 19 2020 to August 12, 2020.

There was no significant decrease in the number of new cases after the phase of the increased incidence of COVID-19. The average number of registered COVID-19 patients in the final phase of the observation period was 93 per day. It has been shown that the frequency of severe forms of COVID-19 is higher in patients of older age groups: in the group of 80 years and older, the frequency of moderate and severe forms of COVID-19 was 69.4%, while in the group under 27 years old — 23.6%. A positive correlation was found between the number of COVID-19 cases and age for the age groups 20–41, 54–60 and 77–83 years (women) and 21–36 and 57–59 years old (men).

Key words: COVID-19, SARS-COV-2, monitoring

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-138>

Введение. Распространение заболевания, вызываемого вирусом SARS-COV-2, приобрело пандемический характер [1]. Тяжёлая эпидемиологическая

ситуация, обусловленная повсеместным и интенсивным распространением COVID-19, стала главной проблемой отечественного здравоохранения. В ряде регионов Российской Федерации, к числу которых следует отнести Ставропольский край, динамика регистрации новых случаев такова, что оценивать эпидемиологическую ситуацию как улучшающуюся, после некоторого снижения числа новых случаев, невозможно [2, 3]. В Ставропольском крае с 18 марта 2020 г. введён режим повышенной готовности, запрещено проведение культурно-просветительных, театрально-зрелищных, выставочных, спортивных и иных мероприятий, введена обязательная термометрия на рабочих местах, наблюдение за гражданами, прибывающими из других государств [4]. С 31 марта введён комплекс ограничительных и иных мероприятий, включающий обязательную самоизоляцию граждан старше 65 лет, ограничение передвижения граждан с введением специальных пропусков. С 6 апреля осуществлён перевод образовательных учреждений на дистанционный режим работы. Первый этап снятия ограничений начался с 11 июня 2020 г. Однако по состоянию на 12 августа в Ставропольском крае продолжал сохраняться стабильно высокий уровень регистрации новых случаев заболевания COVID-19.

Цель исследования. Изучить динамику регистрации новых случаев COVID-19 в Ставропольском крае в период с 19 марта по 12 августа 2020 г. Дать характеристику основным периодам регистрации новых случаев заболевания, описать вовлечённость отдельных категорий населения в эпидемический процесс.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный анализ лабораторно подтверждённых случаев заболевания COVID-19 среди населения Ставропольского края за период с 19 марта по 12 августа 2020 г. Расчёт показателей описательной статистики производился с использованием пакета анализа MS Excel, при расчёте коэффициента корреляции использован коэффициент Пирсона. Средние показатели указаны с учетом 95% доверительного интервала.

Результаты. Регистрация первых, лабораторно подтверждённых, случаев заболевания COVID-19 в Ставропольском крае началась с 19 марта 2020 и к 12 августа зарегистрирован 9571 случай (3,4 случая на 1000 человек). Заболевшие распределились по полу так: 3743 мужчин (39%) и 5828 женщин (61%). Средний возраст женщин составил $48,2 \pm 0,5$ года, средний возраст мужчин — $45,9 \pm 0,6$ года. При анализе распределения количества заболевших женщин по возрасту установлено, что всех заболевших можно условно разделить на несколько групп. В группах женщин моложе 20 лет и с 42 до 53 лет количество заболевших не имеет корреляции с возрастом. В группах с 20 до 41 года, с 54 до 60 лет и с 77 до 83 лет выявлена положительная корреляция количества заболевших с возрастом ($r = 0,96$, $r = 0,92$ и $r = 0,87$ соответственно). В группах женщин с 61 до 76 и старше 83 лет выявлена обратная зависимость количества заболевших с возрастом

($r = -0,94$ и $r = -0,9$ соответственно). Заболевших мужчин можно условно разделить на несколько групп. В группах мужчин моложе 21 года и с 37 до 56 лет количество заболевших не имеет корреляции с возрастом. В группах с 21 до 36 лет, с 57 до 59 лет выявлена прямая корреляция количества заболевших с возрастом ($r = 0,81$ и $r = 0,92$ соответственно). В группе мужчин старше 59 лет выявлена обратная зависимость количества заболевших от возраста ($r = -0,92$).

Анализ долей тяжёлых и среднетяжёлых форм заболевания у женщин и мужчин показал, что в группе моложе 27 лет отсутствует корреляция частоты тяжёлых и среднетяжёлых форм с возрастом ($r = 0,05$), средняя частота таких форм составляет $23,6 \pm 3,8\%$. В возрастной группе женщин и мужчин от 27 до 79 лет с возрастом доля тяжёлых и среднетяжёлых форм заболевания увеличивается ($r = 0,95$), средняя частота таких форм составляет $54,7 \pm 3,8\%$. В группе 80 лет и старше корреляции частоты тяжёлых и среднетяжёлых форм с возрастом не выявлено ($r = 0,34$), средняя частота таких форм составляет $69,4 \pm 13,6\%$.

Среди заболевших женщин доля госпитализированных составила 39% ($N = 4579$), среди мужчин — 43% ($N = 2904$). У женщин в возрастной группе моложе 27 лет средняя частота госпитализации составила $22,6 \pm 3,6\%$, в возрастной группе от 27 до 79 лет — $42,1 \pm 4,5\%$, в возрастной группе 80 лет и старше — $50,3 \pm 13,4\%$. У мужчин в возрастной группе моложе 27 лет средняя частота госпитализации составила $17,1 \pm 4,2\%$, в возрастной группе от 27 до 79 лет — $49,1 \pm 4,5\%$, в возрастной группе 80 лет и старше — $71,7 \pm 11,4\%$.

Распределение заболевших по характеру трудовой деятельности удалось оценить для 5425 заболевших (в группу не вошли дети, пенсионеры и лица с отсутствующими сведениями о характере трудовой деятельности). Среди женщин ($N = 3384$) наибольшее количество заболевших зарегистрировано в группах: временно не работающие — 33,9%; работники медицинских организаций — 33,6%; служащие — 9,6%; рабочие — 9,5%; работники образовательных организаций — 5,8%. Среди мужчин ($N = 2041$) наибольшее количество заболевших зарегистрировано в группах: временно не работающие — 37,9%; рабочие — 20,8; работники медицинских организаций — 11,3%; служащие — 8,6%; работники правоохранительных органов — 4,6%.

Периодизацию эпидемического процесса можно описать следующим образом. Первый лабораторно подтверждённый случай заболевания зарегистрирован 19 марта 2020 г. у жительницы края, вернувшейся из Испании. До 30 марта (период регистрации единичных случаев, длительность 12 дней) в день в среднем регистрировался $1,0 \pm 0,8$ новый случай заболевания. Общее количество заболевших составило 13 человек из них 92% женщины. Средний возраст заболевших женщин составил $46,0 \pm 12,0$, возраст заболевшего мужчины — 24 г. По социальным группам заболевшие женщины распределились так: временно не работающие и студен-

ты — по 30%, работники медицинских организаций, работники образовательных организаций, рабочие и служащие — по 10%. Заболевший мужчина являлся студентом. По степени тяжести случаи заболевания среди женщин распределились так: бессимптомная форма — 58,3%, лёгкая — 16,7%, средняя — 16,7%, тяжёлая — 8,3%. Заболевший мужчина перенес заболевание в бессимптомной форме. Доля госпитализированных лиц среди мужчин — 100%, среди женщин — 91,6%.

В период с 31 марта по 9 апреля (период регистрации множественных случаев, длительность 10 дней) в регионе регистрировалось в среднем по $3,9 \pm 1,6$ новых случаев заболевания в день. Общее количество заболевших составило 39 человек, из них 61,6% женщины. Средний возраст заболевших женщин составил $48,8 \pm 10,1$, средний возраст мужчин — $37,0 \pm 9,4$ года. Наибольшее количество заболевших женщин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 33,3% и работники медицинских организаций — 25,0%. Наибольшее количество мужчин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 63,6%, студенты — 18,2%. Среди женщин на бессимптомную форму пришлось 37,5%, на лёгкую — 16,7%, на среднюю — 37,5%, на тяжёлую — 8,3%. Среди мужчин на бессимптомную форму пришлось 40,0%, на лёгкую — 13,3%, на среднюю 33,3%, на тяжёлую — 13,3%. Все заболевшие были госпитализированы.

Период с 10 апреля по 15 мая можно охарактеризовать как период выраженного эпидемического подъёма заболеваемости (длительность периода — 36 дней), среднее количество новых случаев в день составляло $26,4 \pm 10,4$. Общее количество заболевших составило 953 человека, из них 57,3% женщины. Средний возраст заболевших женщин составил $45,3 \pm 1,6$, средний возраст мужчин — $43,2 \pm 1,9$ года. Наибольшее количество заболевших женщин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 33,2%, работники медицинских организаций — 32,1%. Наибольшее количество мужчин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 34,6%, рабочие — 27,8%. Среди женщин на бессимптомную форму пришлось 45,1%, на лёгкую — 16,1%, на среднюю — 33,5%, на тяжёлую — 5,2%. Среди мужчин на бессимптомную форму пришлось 47,2%, на лёгкую — 13,8%, на среднюю 31,9%, на тяжёлую — 7,2%. Доля госпитализированных среди женщин составила 42,9%, среди мужчин — 51,4%.

Период пиковых значений регистрации новых случаев пришелся на 16 мая, когда зарегистрировано 459 заболевших, доля женщин составила 57,3%. Средний возраст заболевших женщин составил $44,6 \pm 2,2$ года, средний возраст мужчин — $44,0 \pm 2,9$ года. Наибольшее количество заболевших женщин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 37,8%, работники медицинских организаций — 29,3%. Наибольшее количество мужчин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 32,3%, рабочие — 23,1%. Среди женщин на бессимптомную форму пришлось 35,6%, на лёгкую — 18,6%, на сред-

нюю — 42,8%, на тяжёлую — 3,0%. Среди мужчин на бессимптомную форму пришлось 39,7%, на лёгкую — 19,0%, на среднюю — 33,3%, на тяжёлую — 7,9%. Доля госпитализированных среди женщин составила 40,7%, среди мужчин — 48,6%.

С 17 мая по 12 августа уровень заболеваемости оставался стабильно высоким (длительность периода — 87 дней), среднее количество заболевших в день составляло $93,2 \pm 4,0$. Общее количество заболевших составило 8107 человек, из них 61,4% женщины. Средний возраст заболевших женщин составил $48,7 \pm 0,5$, средний возраст мужчин — $46,5 \pm 0,7$ года. Наибольшее количество заболевших женщин относились к следующим социальным группам: работники медицинских организаций — 34,2%, временно не работающие — 33,8%. Наибольшее количество мужчин относились к следующим социальным группам: временно не работающие — 38,8%, рабочие — 19,6%. Среди женщин на бессимптомную форму пришлось 19,5%, на лёгкую — 28,7%, на среднюю — 46,5%, на тяжёлую — 5,3%. Среди мужчин на бессимптомную форму пришлось — 19,9%, на лёгкую — 26,7%, на среднюю — 46,7%, на тяжёлую — 6,7%. Доля госпитализированных среди женщин составила 38,0%, среди мужчин — 41,0%.

Выводы. 1. По состоянию на 12 августа в Ставропольском крае продолжал регистрироваться стабильно высокий уровень выявления новых случаев COVID-19. В среднем в этот период в день регистрировалось 93 новых лабораторно подтверждённых случая.

2. В группах женщин с 20 до 41 года, с 54 до 60 лет и с 77 до 83 лет, а также мужчин с 21 до 36 лет и с 57 до 59 лет выявлена положительная корреляция количества заболевших с возрастом.

3. Доля среднетяжёлых и тяжёлых форм в возрастной группе до 27 лет составила в среднем $23,6 \pm 3,8\%$, в возрастной группе 27–79 лет — $54,7 \pm 3,8\%$, в группе старше 80 лет — $69,4 \pm 13,6\%$.

4. Наибольшая вовлечённость в эпидемический процесс среди женщин выявлена в группах временно не работающих, работников медицинских организаций и служащих. Среди мужчин — в группах временно не работающих, рабочих и работников медицинских организаций.

Литература

1. COVID-19 situation updates worldwide. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>
2. Оперативные данные. Правительство Российской Федерации. <https://xn--80aesfpebagmfb1c0a.xn--p1ai/information/>
3. Карта распространения новой коронавирусной инфекции в Российской Федерации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. <https://covid19.rosminzdrav.ru/>
4. Постановление губернатора Ставропольского края от 16 марта 2020 г. «О введении на территории Ставропольского края режима повышенной готовности»



ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА К ВИРУСУ SARS-COV-2 СРЕДИ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН С РАЗЛИЧНЫМ РИСКОМ ИНФЕКЦИИ COVID-19

Г.Ш. Исаева^{1,3}, И.Д. Решетникова^{1,2}, Е.В. Агафонова^{1,3}, Ю.А. Тюрин^{1,3}, С.Н. Куликов^{1,2}, Г.Ф. Гильязутдинова¹, Д.В. Лопушов^{3,4}, В.Б. Зиятдинов¹

¹ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань;

²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань;

³ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», Казань;

⁴ГБОУ ДПО РМАНПО «Казанская государственная медицинская академия» — филиал ГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань

Ключевые слова: антитела IgG к вирусу SARS-CoV-2; серопревалентность антител IgG к вирусу SARS-CoV-2

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-143>

ASSESSMENT OF IMMUNE RESPONSE INTENSITY TO SARS-CoV-2 VIRUS AMONG MEDICAL WORKERS WITH VARIED RISKS OF COVID-19 INFECTION IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN

G.S. Isaeva^{1,3}, I.D. Reshetnikova^{1,2}, E.V. Agafonova^{1,3}, Y.A. Tyurin^{1,3}, S.N. Kulikov^{1,2}, G.F. Gilyazutdinova¹, D.V. Lopushov^{3,4}, V.B. Ziatdinov¹

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia;

²Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Russia;

³Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

⁴Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Key words: SARS-CoV-2 IgG antibodies, SARS-CoV-2 IgG seroprevalence

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-143>

Материалы и методы. Материалом исследования служили образцы сыворотки крови 348 медицинских работников (МР) из медицинских учреждений Казани. Все медицинские учреждения были разделены на три группы. Первая группа (предполагаемый «высокий риск») учреждений включала в себя стационары, которые были перепрофилированы для оказания медицинской помощи больным новой коронавирусной инфекцией. Вторая группа (предполагаемый «умеренный риск») включала станцию скорой медицинской помощи (ССМП) и медицинскую организацию, оказывающую амбулаторно-поликлиническую помощь (АПП), третья группа (предполагаемый «низкий риск») — специализированную диагностическую поликлинику (СДП). Для определения специфических антител (АТ) IgG использовался двухстадийный непрямой вариант твердофазного ИФА

«SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ». Интенсивность иммунного ответа оценивали с помощью коэффициента позитивности (КП).

Результаты. Среднее значение серопревалентности АТ IgG к вирусу SARS-CoV-2 для различных медицинских учреждений Казани варьировало в пределах 6,1–23,3%: в первой группе — от 3,3 до 30,3% (среднее — 16,4%), во второй группе — от 15,0 до 27,5% (среднее — 23,3%), в третьей группе — 6,1%.

В целом в группе МР с серопозитивными результатами отмечается превалирование доли с очень высоким коэффициентом позитивности (49,1%), что характеризует высокую напряжённость иммунного ответа. Низкий КП отмечен у 19,2% серопозитивных МР. Отмечена корреляция между величиной серопревалентности у МР медицинского учреждения с долей образцов, показавших высокие значения КП ($R = 0,86$). Наибольшая доля образцов с высоким КП наблюдалась в группе учреждений, перепрофилированных для оказания медицинской помощи больным новой коронавирусной инфекцией и составляла 72,5%, а также у МР ССМП (63%). Наименьшая доля проб с высокими значениями КП наблюдалась в СДП и АПП.

Выводы. Широкое варьирование значений серопревалентности в группах МР различных организаций может свидетельствовать о разном уровне интенсивности профессиональных контактов и эффективности противоэпидемических мероприятий в данных учреждениях.



ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА N SARS-COV-2 ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИФА

И.С. Кассиров, Е.А. Гончарова, Е.В. Зуева, А.С. Долгова

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Ключевые слова: SARS-Cov-2, белок N, ИФА

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-145>

PRODUCTION OF THE RECOMBINANT SARS-COV-2 N PROTEIN FOR ELISA-BASED DIAGNOSTIC SYSTEMS

I.S. Kassirov, E.A. Goncharova, E.V. Zueva, A.S. Dolgova

Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Moscow

Key words: SARS-Cov-2, N protein, ELISA

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-145>

Введение. Для определения и мониторинга иммунной прослойки населения, имеющей антитела к вирусу SARS-CoV-2, необходимо создание отечественных систем диагностики, основанных на методе ИФА. Системы могут состоять не только из антигенов лизата инфицированных клеток, но и из определённых рекомбинантных белков. Такой подход зачастую помогает увеличить специфичность анализа. В случае SARS-CoV-2 наиболее специфичным является нуклеокапсидный белок N.

Цель исследования. Получение продуцента N белка SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Для получения гена белка N с РНК-матрицы на первом этапе проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора Реверта-L, а на втором — ПЦР со специфическими праймерами, содержащими сайты рестрикции. Полученный фрагмент 1260 п. н. был клонирован в pGEM для дальнейшей наработки в *E. coli* XL-1 Blue и секвенирования. Кодировующий N белок фрагмент был вставлен по сайтам BamHI/NotI в экспрессионный вектор pGD. Полученной конструкцией pGD-Covid19-Nprot трансформировали штамм *E. coli* BL-21 и проводили оптимизацию индукции IPTG для получения максимального выхода. Клетки *E. coli* культивировали при 37°C, на чашках с LB агаром (Panreac), или в LB бульоне (Panreac) при 200 об/мин. Оптимизация процесса культивирования включала в себя процесс подбора оптимальной концентрации IPTG (0,5 или 1 мМ) и оптимального времени культивирования в диапазоне от 0,5 ч до 2,5 ч при 30°C. Нарботка биомассы для последующей очистки производилась согласно ранее подобраным параметрам в 75 мл среды с последующим центрифугированием при +4°C

и 10 000 об/мин. Выход белка в тех или иных условиях определяли методом электрофореза в ПААГ по Лэммли.

Результаты и выводы. Получен экспрессионный вектор для наработки рекомбинантного нуклеокапсидного белка N вируса SARS-CoV-2 в клетках *E. coli* и штамм продуцент на его основе. Результатом оптимизации экспрессии было определение параметров для наиболее эффективной экспрессии N-белка. Наибольшая продукция белка отмечалась при культивировании в течение 2 ч с индукцией IPTG в концентрации 0,5 мМ. Эти условия были использованы для создания протокола индукции и наработки биомассы.



МУТАЦИИ В ГЕНОМАХ SARS-COV-2 БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В КОНЦЕ МАРТА – НАЧАЛЕ АПРЕЛЯ ОТ ПАЦИЕНТОВ ГОРОДА МОСКВЫ

В.В. Каптелова*†, А.С. Сперанская†, А.Е. Самойлов, А.В. Валдохина, Е.П. Буланенко, Е.В. Корнеенко, О.Ю. Шипулина, В.Г. Акимкин

ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Неоднократно высказывались предположения, что мутация D614G в S-белке SARS-CoV-2 может влиять на способность передачи вируса. В недавней работе было отмечено, что на скорость передачи заболевания и на скорость репликации вируса оказывает влияние не одиночная мутация D614G, а её комбинация с мутацией P323L в белке РНК-зависимой РНК-полимеразы. Мы определили последовательности полных геномов для 28 вирусов SARS-CoV-2, полученных из образцов, представляющих собой клинический материал мазок/отделяемое ротоглотки от пациентов разных возрастов. Проанализированные изоляты принадлежат к линиям B.1 (GH) и B.1.1 (GR). Во всех геномах были обнаружены сочетания мутаций P323L в области РНК-зависимой РНК-полимеразы и D614G в гене S-белка. Обнаруженные отличия могут быть объяснены выборкой: для полногеномного секвенирования отбирались только образцы с высокой вирусной нагрузкой, которая могла быть обусловлена именно высокой скоростью размножения вируса в организме хозяина, что, в свою очередь, может иметь связь с наличием в геноме вируса мутаций P323L/D614G.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, мутации, D614G, P323L, NGS

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-147>

MUTATIONS IN THE GENOMES OF SARS-COV-2 FROM CLINICAL SAMPLES OBTAINED IN LATE MARCH-EARLY APRIL FROM PATIENTS IN MOSCOW

V.V. Kaptelova*†, A.S. Speranskaya†, A.E. Samoilov, A.V. Valdokhina, V.P. Bulanenko, E.V. Korneenko, O.Y. Shipulina, V.G. Akimkin

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

Many papers suggested that D614G mutation in the viral spike (S) protein SARS-CoV-2 can influence the ability of virus transmission. In recent work [1], it was shown D614G influences the rate of disease transmission only in combination with the P323L mutation in the viral polymerase. We have sequenced 28 full genomes of SARS-CoV-2, obtained from clinical material from patients of different ages. The analyzed isolates belong to clades B.1 (GH) and B.1.1 (GR). Combinations of mutations P323L and D614G were found in all genomes. These differences can be explained by sampling: the samples for the sequencing of the whole genome were selected with high viral load, it can be related to the rate of viral replication in

† Равный вклад.
Contributed equally.

intra-host. That, in turn, can be dependent on the presence of P323L/D614G mutations in the virus genome.

Key words: SARS-CoV-2, mutations, D614G, P323L, NGS

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-147>

Введение. Новое респираторное заболевание COVID-19, вызванное вирусом SARS-CoV-2, охватило весь мир и получило статус пандемии. Заражение нулевого пациента произошло в Ухани, и далее инфекция распространилась по всему миру. На сегодняшний день учёные из разных регионов мира пытаются рассмотреть и проанализировать геномные изменения SARS-CoV-2 с помощью молекулярно-генетических методов и выяснить, какие именно генетические особенности вируса могут быть связаны с различной тяжестью течения заболевания. Трансмембранный гликопротеин S-белок SARS-CoV-2 является белком вирусной оболочки, он способствует прикреплению вируса к рецепторам на поверхности клетки-хозяина и отвечает за слияние с ней [1]. Неоднократно высказывались предположения, что мутация D614G в S-белке может улучшать адгезию и, как следствие, увеличивать вероятность передачи вируса (от хозяина к хозяину) [2]. По данным всемирной базы GISAID, мутация D614G в S-белке встречается в 76,53% последовательностей (по данным на 20 августа 2020 г.); первый полногеномный сиквенс, в котором она была зарегистрирована, — hCoV-19/England/NORW-E82AE/2020 [3]. В недавней работе [1] было высказано предположение, что на скорость передачи заболевания и на репликацию вируса оказывает влияние не одиночная мутация D614G, а её комбинация с мутацией P323L в белке РНК-зависимой РНК-полимеразы [1]. Те же авторы предполагают коэволюцию участков генома SARS-CoV-2, что приводит к независимому неоднократному формированию обеих аминокислотных замен P323L и D614G в разных эволюционных линиях.

Цель работы. Определить полные последовательности геномов SARS-CoV-2 из образцов, полученных из КДЛ, от пациентов города Москвы, с подтверждённым наличием вируса в конце марта–начале апреля, описать обнаруженные мутации и определить, как часто встречается комбинация мутаций P323L/D614G.

Материалы и методы. Образцы мазков от пациентов с симптомами ОРВИ или подозрениями на SARS-CoV-2 были обработаны в лаборатории молекулярной диагностики ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (лаборатория имеет разрешение для работы с ПБА) с использованием набора реагентов AmpliSens® CoV-Bat-FL для обнаружения SARS-CoV-Family, включающий новый SARS-CoV-2 в соответствии с инструкцией производителя. Для амплификации геномов мы использовали остатки образцов РНК, хранившихся в клинической

лаборатории. Были отобраны образцы, в которых была выявлена РНК SARS-CoV-2 со значением $Ct \leq 20$. Нами была разработана праймерная панель для амплификации полного генома, состоящая из 17 пар праймеров [4]. Реакцию обратной транскрипции проводили набором Reverta-L kit (AmpliSens, Russia) согласно инструкции производителя. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для амплификации фрагментов генома. Фрагменты генома SARS-CoV-2 размером около 2000 п. н. амплифицировали с использованием разработанных праймеров [4].

Предварительно смешанные и очищенные ПЦР-продукты (17–300 нг для образца) были фрагментированы в microTUBE-50 AFA Fiber Screw-Cap (PN 520166) с использованием Covaris M220 (Covaris, Woburn, MA). Парное лигирование было произведено набором NEBNext® Ultra™ End Repair/dA-Tailing Module (NEB E7442L), NEBNext® Ultra™ Ligation Module (NEB E7445L) and Y-shaped adapters compatible with Nextera XT Index Kit. Амплификацию библиотеки проводили Q5 High-Fidelity ДНК-полимеразой в 25 мкл согласно инструкции производителя (New England BioLabs, NEB) с 10 циклами амплификации. Также использовали другой метод приготовления библиотек, называемый Nextera™ Library Prep (Illumina, USA), согласно инструкции производителя. Выбор размера конечных библиотек производился с использованием Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Danvers, MA, USA). Длину фрагментов полученных библиотек оценивали на Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). Секвенс был выполнен на Illumina HiSeq 1500 с использованием набора реагентов HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 и HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500 циклов) или Illumina MiSeq с набором MiSeq Reagent Kit V2 (500 циклов). Обработка данных производилась методом, описанным ранее [4].

Результаты. Мы определили последовательности полных геномов для 28 вирусов SARS-CoV-2 из образцов, представляющих собой биологический материал (мазок/отделяемое ротоглотки) от пациентов разных полов в возрасте от 20 до 82 лет. Данные доступны в базе данных GISAD (таблица). Был проведён филогенетический анализ последовательностей (из-за ограничения по формату данные не представлены), мы обнаружили, что последовательности вирусов не выделяются в отдельную кладу, а демонстрируют родство с вирусами европейского и американского происхождения. Проанализированные изоляты принадлежат к линиям B.1 (GH) (к ней относятся 6 (21,4%) проанализированных последовательностей) и B.1.1 (GR) (22 (78,6%) проанализированных последовательностей). Во всех геномах были обнаружены сочетания мутаций P323L в области РНК-зависимой РНК-полимеразы и D614G в гене S-белка (см. таблицу). Также часто встречались мутации R203K и G204R, в гене, кодирующем нуклеокапсидный белок, они были найдены в 20 (71%) и 19 (67%) проанализиро-

№	Название	GISAD ID	Линия	Мутации	Предварительный диагноз / по МКБ / Z20.8	Возраст пациента	Пол
1	hCoV-19/Russia/ CRIE187963/2020	EPI_ISL_486829	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	Контакт с больным / Z20.8	27	М
2	hCoV-19/Russia/ CRIE176675/2020	EPI_ISL_486828	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; P199S, R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	20	М
3	hCoV-19/Russia/ CRIE175960/2020	EPI_ISL_486827	B.1.1 (GR)	D218E; P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	43	М
4	hCoV-19/Russia/ CRIE170180/2020	EPI_ISL_486826	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	36	Ж
5	hCoV-19/Russia/ CRIE168693/2020	EPI_ISL_486825	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	Пневмония / J18.9	48	Ж
6	hCoV-19/Russia/ CRIE164980/2020	EPI_ISL_486824	B.1.1 (GR)	D218E, P1326L; P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	25	Ж
7	hCoV-19/Russia/ CRIE164399/2020	EPI_ISL_486823	B.1.1 (GR)	P323L; T16A; D614G; R203K	ОРВИ / J06.9	40	М
8	hCoV-19/Russia/ CRIE164298/2020	EPI_ISL_486822	B.1.1 (GR)	T176A; P323L; D614G; R134H	ОРВИ / J06.9	29	Ж
9	hCoV-19/Russia/ CRIE162398/2020	EPI_ISL_486821	B.1.1 (GR)	D218E; P323L; D614G; R203K, G204R	Острый бронхит / J20.9	54	М
10	hCoV-19/Russia/ CRIE161143/2020	EPI_ISL_486820	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	63	Ж
11	hCoV-19/Russia/ CRIE160790/2020	EPI_ISL_486819	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	Контакт с больным / Z20.8	32	М
12	hCoV-19/Russia/ CRIE160277/2020	EPI_ISL_486818	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R, Q418H	ОРВИ / J06.9	39	Ж
13	hCoV-19/Russia/ CRIE159932/2020	EPI_ISL_486817	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	79	М
14	hCoV-19/Russia/ CRIE159875/2020	EPI_ISL_486816	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; A152S, R203K, G204R	Контакт с больным / Z20.8	54	N/A

№	Название	GISAD ID	Линия	Мутации	Предварительный диагноз / по МКБ	Возраст пациента	Пол
15	hCoV-19/Russia/ CRIE159560/2020	EPI_ISL_486815	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	Контакт с больным / Z20.8	30	Ж
16	hCoV-19/Russia/ CRIE155506/2020	EPI_ISL_479624	B.1.1 (GR)	P323L, V359I; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	57	М
17	hCoV-19/Russia/ CRIE180117/2020	EPI_ISL_479623	B.1 (GH)	Q1884H; P323L; D614G; Q57H	Наблюдение при подозрении на другие болезни / Z03.8	64	N/A
18	hCoV-19/Russia/ CRIE164776/2020	EPI_ISL_479622	B.1 (GH)	Q1884H; P323L; D614G; Q57H	Наблюдение при подозрении на другие болезни / Z03.8	82	М
19	hCoV-19/Russia/ CRIE161454/2020	EPI_ISL_479621	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	28	М
20	hCoV-19/Russia/ CRIE182061/2020	EPI_ISL_479620	B.1.1 (GR)	P395L; P323L; D614G, H1101Y; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	21	М
21	hCoV-19/Russia/ CRIE130014/2020	EPI_ISL_470539	B.1 (GH)	T85I; P323L; D614G; Q57H; E39D	N/A	N/A	Ж
22	hCoV-19/Russia/ CRIE139642/2020	EPI_ISL_467775	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	ОРВИ / J06.9	N/A	М
23	hCoV-19/Russia/ CRIE163844/2020	EPI_ISL_467774	B.1 (GH)	Q1884H; P323L; D614G; Q57H	N/A	N/A	Ж
24	hCoV-19/Russia/ CRIE162784/2020	EPI_ISL_462150	B.1.1 (GR)	D218E; P323L; D614G; R203K, G204R	N/A	N/A	N/A
25	hCoV-19/Russia/ CRIE160583/2020	EPI_ISL_462149	B.1 (G)	A318V; P323L; D614G	N/A	N/A	Ж
26	hCoV-19/Russia/ CRIE140762/2020	EPI_ISL_460605	B.1 (GH)	T85I; P323L; D614G; Q57H	N/A	N/A	Ж
27	hCoV-19/Russia/ CRIE145922/2020	EPI_ISL_460604	B.1.1 (GR)	P323L; D614G; R203K, G204R	N/A	N/A	М
28	hCoV-19/Russia/ CRIE156278/2020	EPI_ISL_460096	B.1 (GH)	T85I; P323L; G13E; S33R, I112V; D614G; Q57H	N/A	N/A	Ж

ванных образцов соответственно. Обе мутации, по данным GISAID, относятся к достаточно распространённым. Их встречаемость среди проанализированных последовательностей SARS-CoV-2 во всём мире составляет 32,30% и 32,21% соответственно. Также были найдены редкие варианты SNP мутаций, такие как T16A (помимо последовательности, описываемой в настоящей работе, такая мутация наблюдалась всего в двух последовательностях SARS-CoV-2 из базы GISAID), V359I (наблюдалась также в двух последовательностях из базы GISAID) и E39D (также найдены всего в двух последовательностях, по данным GISAID). В одном из образцов (GISAID ID EPI_ISL_462149) был обнаружен сдвиг рамки считывания в позиции 27330 (ORF6).

Выводы. Мы обнаружили сочетание мутации P323L и D614G во всех проанализированных геномах, образцы были получены от пациентов самых разных возрастных групп, для анализа отбирали материал только с высокой вирусной нагрузкой ($C_t \leq 20$). Сочетание мутаций P323L и D614G было обнаружено во всех проанализированных последовательностях, в отличие от данных GISAID, в которой показано, что мутация D614G встречается в 76,53% последовательностей, мутация P323L — в 76,24%. Обнаруженные отличия могут объяснены выборкой: для полногеномного секвенирования отбирались только образцы с высокой вирусной нагрузкой, которая могла быть обусловлена именно высокой скоростью размножения вируса в организме хозяина, что, в свою очередь, может иметь связь с наличием в геноме вируса мутаций P323L/D614G.

Литература

1. Ilmjärv S., Abdul F., Acosta-Gutiérrez S. *et al.* Epidemiologically most successful SARS-CoV-2 variant: concurrent mutations in RNA-dependent RNA polymerase and spike protein. *medRxiv* 2020.08.23.20180281; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.23.20180281>.
2. Zhang L. *et al.* The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *bioRxiv: the preprint server for biology* 2020.06.12.148726. 12 Jun. 2020, doi:10.1101/2020.06.12.148726
3. Isabel S., Graña-Miraglia L., Gutierrez JM, *et al.* Evolutionary and structural analyses of SARS-CoV-2 D614G spike protein mutation now documented worldwide. *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10 (1). P.14031. Published 2020 Aug 20. doi:10.1038/s41598-020-70827-z
4. Speranskaya A. S., Kaptelova V.V. *et al.* SCV-2000bp: a primer panel for SARS-CoV-2 full-genome sequencing. *bioRxiv: the preprint server for biology*. 2020.08.04.234880; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.234880>



РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ SARS-COV-2 И ДРУГИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ МЕТОДОМ ПЦР В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ В АПРЕЛЕ–ИЮЛЕ 2020 г.

**А.Н. Косырева, И.В. Бакштановская, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова,
Е.А. Зматракова, А.З. Бартусевич, С.А. Леонтьева, А.О. Вишнякова, Ц.А. Панина**

ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека, Тюмень

Ключевые слова: пневмония, ПЦР, SARS-CoV-2, ко-инфекции

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-153>

RESULTS OF DETECTING SARS-COV-2 AND OTHER PATHOGENS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA BY PCR IN THE TYUMEN OBLAST IN APRILE–JULY 2020

**A.N. Kosyreva, I.V. Bakshtanovskaya, T.F. Stepanova, K.B. Stepanova, E.A. Zmatrakova,
A.Z. Bartusevich, S.A. Leonteva, A.O. Vishnyakova, C.A. Panina**

Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of the Federal Service for Supervision
of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Tyumen, Russia

Key words: pneumonia, PCR, SARS-CoV-2, co-infections

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-153>

Введение. Для заболевания, вызываемого SARS-CoV-2, характерно преимущественное поражение нижних дыхательных путей, поэтому в период пандемии выявление этиологических агентов внебольничных пневмоний особенно актуально.

Цель исследования. Выявление возбудителя внебольничных пневмоний и ко-инфицирования с помощью исследования биоматериала от пациентов методом ПЦР.

Материалы и методы. Исследование 268 проб от 258 пациентов, больных внебольничной пневмонией, проведено методом ПЦР для выявления РНК/ДНК следующих возбудителей: 1) коронавирус SARS-CoV-2; 2) коронавирусы, вызывающие тяжёлую респираторную инфекцию; 3) микобактерии туберкулёза; 4) возбудители ОРВИ; 5) вирусы гриппа А и В; 6) субтипы вируса гриппа А; 7) возбудители коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза; 8) *Legionella pneumophila*; 9) *Listeria monocytogenes*; 10) *Brucella spp.*; 11) *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae*.

Результаты. В 116 из 268 проб (43,3%) выявлена РНК SARS-CoV-2. В 3 случаях у пациентов обнаружено одновременно наличие РНК SARS-CoV-2

и SARS-CoV. В 2 образцах выявлена только РНК SARS-CoV. Из 14 проб больных туберкулёзом в 9 была обнаружена РНК SARS-CoV-2, у 1 — аденовирус. РНК/ДНК возбудителей ОРВИ обнаружены в 12 пробах мокроты и мазков (4,5%). В 2 пробах мокроты обнаружены одновременно РНК вируса парагриппа 2 типа и коронавирусов NL-63, 229E. В 1 пробе выявлено наличие ДНК *Mycoplasma pneumoniae*. В 2 случаях в пробах мокроты обнаружено сочетание ДНК микобактерий туберкулёза с ДНК аденовирусов (в одном случае) и *Brucella spp.* (во втором).

РНК возбудителей гриппа и ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхосептикоза, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* и *Chlamydomphila pneumoniae* не обнаружены.

В весенний период в 28 из поступивших 98 проб (28%) выявлено наличие РНК SARS-CoV-2 (в апреле–мае в пробах без нового коронавируса обнаружены РНК/ДНК возбудителей ОРВИ). В летние месяцы среди поступивших 160 проб в 86 (53,8%) обнаружена РНК SARS-Cov-2, возбудители ОРВИ и гриппа не выявлялись, однократно обнаружена ДНК *Mycoplasma pneumoniae*.

У обследованных больных пневмонией РНК SARS-Cov-2 существенно чаще выявлялась в биоматериале из нижних дыхательных путей (52%, 112 проб из 214), чем в респираторных мазках (8,5%, 4 из 47 проб). Эти результаты согласуются с литературными данными. Вероятно, существует определённая динамика выявления РНК нового коронавируса в мокроте в зависимости от длительности заболевания к моменту забора проб: в 1-ю неделю от начала заболевания обнаружено 19,2% положительных проб, во 2-ю — 56,5 %.

Выводы. Таким образом, в условиях пандемии при установлении этиологии внебольничных пневмоний необходима «ковидная настороженность», особенно в летний период (при низкой вероятности вирусных пневмоний, связанных с ОРВИ). Полученные результаты свидетельствуют, что для установления этиологического агента необходимо проводить исследования наиболее показательного биоматериала (при пневмониях — из нижних дыхательных путей) и в соответствующие сроки от начала заболевания.



РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ ВНЕШНЕГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ COVID-19

Н.И. Мезенцева¹, С.В. Лаптев²

¹Ассоциация специалистов некоммерческое партнерство «Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований», Москва;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», Москва

Ключевые слова: COVID-19, ПЦР-диагностика, внешний контроль качества

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-155>

PROGRAM DEVELOPMENT AND ORGANIZATION OF EXTERNAL QUALITY CONTROL OVER COVID-19 PCR DIAGNOSTICS

N.I. Mezentsseva¹, S.V. Laptev²

¹Partnership «Center for External Control Assessment of the Quality of Clinical Laboratory Studies», Moscow, Russia;

²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin, Moscow, Russia

Key words: COVID-19, PCR diagnostics, EQA

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-155>

Введение. В декабре 2019 г. новый коронавирус вызвал вспышку острой респираторной инфекции в г. Ухань (Китай), в короткие сроки распространившейся по миру. 11 февраля 2020 г. ВОЗ присвоила вирусу официальное название SARS-CoV-2. На сегодняшний день выделяют два типа SARS-CoV-2: тип L (70% всех штаммов) и тип S (30% штаммов). ВОЗ приняла решение в публичной сфере называть новое заболевание COVID-19. 25 марта 2020 г. ВОЗ присвоила COVID-19 коды Международной Классификации Болезней 10 (МКБ-10): код U07.1 — диагнозу заболевания, подтверждённому лабораторными исследованиями; код U07.2 — клиническому или эпидемиологическому диагнозу, когда лабораторное подтверждение не является окончательным или отсутствует.

Лабораторная диагностика COVID-19 осуществляется в соответствии с требованиями санитарного законодательства РФ по работе с микроорганизмами II группы патогенности. Для выявления коронавируса SARS-CoV-2 Росздравнадзор в начале пандемии COVID-19 одобрил 13 диагностических наборов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), 3 набора — методом изотермической амплификации. Также в России (ВНИИЗЖ) разработаны наборы реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 у животных, проявляющих клинические признаки респираторного заболевания, вызванного COVID-19.

Цель исследования. Разработать и внедрить в Российской Федерации Программу межлабораторных сличительных испытаний МСИ – «ФСВОК» в клинико-диагностических лабораториях (КДЛ) по выявлению РНК SARS-CoV-2.

Материалы и методы. В качестве положительных проб образцов проведения МСИ использовали транскрипты РНК SARS-CoV-2 с концентрацией не ниже 2×10^4 копий/мл. Отрицательные пробы не содержали РНК SARS-CoV-2. Требования к безопасности: все образцы не содержали способных к размножению вирусных частиц SARS-CoV-2 и других возбудителей инфекционных заболеваний.

Перечень наборов реагентов для амплификации, использованных участниками МСИ – «ФСВОК-2020»:

- SARS-CoV/SARS-CoV-2, ДНК-технология;
- SARS-Cov2/SARS-CoV, REF R3-P436-S3/9, ДНК-технология;
- SARS-CoV-2-ПЦР-ОТ, ООО «Медипалтех»;
- SBT-OX-SARS-CoV-2, Система БиоТех;
- АмплиСенсCov-Bat-FL, ЦНИИЭ Роспотребнадзора;
- АмплиТест SARS-CoV-2, ФГБУ ЦСП Минздрава;
- Вектор-ПЦР PB-2019-nCoV-RG;
- Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин, МБС-Технология;
- ПЦР-PB-2019-nCoV48, ЦНИИ «Минобороны»;
- РеалБест РНК SARS-CoV-2, Вектор-Бест.

Результаты. Разработаны технические требования и программа проведения МСИ «ФСВОК» по выявлению РНК SARS-CoV-2 методами ПЦР и изотермической амплификации. В программе МСИ – «ФСВОК» по выявлению РНК SARS-CoV-2 приняли участие 40 лабораторий из 29 регионов России. По результатам МСИ во всех лабораториях получены правильные результаты при ПЦР-исследовании образцов, содержащих транскрипты РНК коронавируса SARS-CoV-2. При использовании метода изотермической амплификации выявлены один ложноположительный и один ложноотрицательный результат.

Выводы. Разработана и проводится в РФ Программа МСИ – «ФСВОК», которая позволяет оценить качество выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 лабораториями-участниками. Ветеринарные лаборатории, применяющие наборы реагентов для выявления коронавируса SARS-CoV-2 у животных, не приняли участие в программах МСИ – «ФСВОК», поэтому сведений о внешней оценке качества данных исследований нет.



МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2, ПРИ АУТОПСИИ

Н.В. Мозгалёва¹, П.А. Ведяпин¹, Ю.Г. Пархоменко^{1,2}

¹ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 2» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Ключевые слова: ПЦР-диагностика, аутопсия, SARS-CoV-2, COVID-19, морфологическое исследование, коронавирусная инфекция

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-157>

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC VERIFICATION OF CORONAVIRUS INFECTION COVID-19 DURING AUTOPSY

N.V. Mozgaleva¹, P.A. Vedyapin¹, Yu.G. Parkhomenko^{1,2}

¹Infectious diseases clinical hospital No. 2 of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia;

²Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Key words: PCR, autopsy, SARS-CoV-2, COVID-19, morphological examination, coronavirus infection

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-157>

Введение. Выявление вируса SARS-CoV-2 в биоматериале больного методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) является критерием подтверждения новой коронавирусной инфекции COVID-19 в клинической и патологоанатомической практике.

Цель исследования. Оценить возможности морфологического и ПЦР исследований в посмертной диагностике COVID-19.

Материалы и методы. Проанализировано 259 случаев аутопсии умерших в г. Москве с апреля по сентябрь 2020 г. с клиническим диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2» или при подозрении на COVID-19 в ходе патологоанатомического вскрытия. Из 259 умерших — 144 мужчин и 115 женщин. Средний возраст — 63,3 г. (от 20 до 99 лет, медиана 66, мода 83). 56 умерших были ВИЧ-инфицированы. Образцы трахеи, лёгких и селезёнки исследовали гистологическими методами и выполняли ПЦР-исследование для обнаружения РНК SARS-CoV-2.

Результаты. Положительные результаты выявления РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР получены в 121 случае, из них в 78 случаях (64%) коронавирус выявлен во всех трёх пробах, в 25 (21%) — в 2 пробах в различных сочетаниях;

изолированное выявление отмечено в трахее в 7 случаях (6%), в лёгких — в 8 (7%), в селезёнке — в 3 (2%). При гистологическом исследовании в лёгких во всех ПЦР-положительных образцах обнаружены разнообразные изменения преимущественно неспецифического характера, в том числе отражающие различные фазы диффузного альвеолярного повреждения: альвеолярный отёк с формированием гиалиновых мембран, альтеративные и пролиферативные изменения альвеолярного эпителия, интерстициальный фиброз. Также встречались циркулярные нарушения, признаки интерстициального воспаления, бактериальной инфекции. Отрицательные результаты ПЦР отмечены при перенесённой коронавирусной инфекции с преобладанием лёгочного фиброза, а также при пневмониях другой этиологии, в частности, ВИЧ-ассоциированных.

Выводы. Таким образом, с учётом отсутствия специфической морфологической картины, ПЦР-исследование является необходимым аспектом посмертной диагностики при подозрении на COVID-19. Комплексный анализ результатов клинических, морфологических, молекулярно-биологических, бактериологических исследований позволяет не только установить этиологию патологического процесса, но и определить фазу его развития и роль в танатогенезе.



ДИНАМИКА АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ АНТИГЕНАМ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 У БОЛЬНЫХ С ПОДТВЕРЖДЁННОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19

Л.И. Новикова¹, С.С. Бочкарева¹, А.В. Алешкин¹, С.Ю. Комбарова¹, О.Э. Карпов²,
А.А. Пулин², О.А. Орлова², Ю.С. Лебедин⁴, А.М. Воробьев¹, Э.Р. Мехтиев¹

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва;

²ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, Москва;

³ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk;

⁴ООО «Хема», Москва

Определено наличие антител IgG и IgM в венозной крови 76 пациентов с подтверждённым наличием SARS-CoV-2. Исследование проводилось методом ИФА с использованием российских наборов реагентов. Выявлен различный уровень антител IgM к N-белку и RBD. Уровень IgM к RBD не достигал высоких значений, в то время как уровень IgM к N-белку резко увеличивался за короткий промежуток времени до высоких значений к 3-й неделе заболевания и снижался только к 8-й неделе. Динамика IgG-антител к цельновирионному антигену и рекомбинантным антигенам шипа была схожей, достигая высоких значений на 4–5-й неделе заболевания, однако динамика IgG к N-белку отличалась, показывая не-большой рост к 1-й неделе заболевания и невысокий уровень в течение всего срока наблюдения. Отмечена различная динамика выработки IgG и IgM антител к N-белку и RBD. Количество IgM к N-белку резко возрастало и достигало высокого уровня, в то время как количество IgG возрастало плавно и не показывало высокого уровня. Обратная картина наблюдалась для антител к RBD. Характерная динамика IgG, измеренная с помощью тест-систем с сорбированными цельным вирионом или рекомбинантными белками шипа, позволяет предположить продолжительность заболевания.

Ключевые слова: антитела, сероконверсия, динамика, гуморальный иммунитет, SARS-CoV-2, COVID-19

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-159>

DYNAMICS OF ANTIBODIES TO VARIOUS ANTIGENS OF THE SARS-COV-2 CORONAVIRUS IN PATIENTS WITH CONFIRMED COVID-19 INFECTION

L.I. Novikova¹, S.S. Bochkareva¹, A.V. Aleshkin¹, S.IU. Kombarova¹, O.E. Karpov²,
A.A. Pulin², O.A. Orlova², I.U.S. Lebedin⁴, A.M. Vorobev¹, E.R. Mekhtiev¹

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

²Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russia;

³State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russia;

⁴XEMA Co. Ltd., Moscow, Russia

Presence of IgG and IgM antibodies in venous blood of 76 patients with confirmed presence of SARS-CoV-2 was determined. The study was carried out by ELISA using Russian test systems. Revealed different levels of IgM antibodies to N-protein and RBD (receptor binding domain of the Spike protein). The level of IgM to RBD did not reach high values, while the level of IgM to N-protein sharply increased in a short period of time to high values by the 3rd week of the disease and decreased only by the 8th week. The dynamics of IgG antibodies to the whole virion antigen and the recombinant spikes was similar, reaching high values at 4-5 weeks of the disease, however, the dynamics of IgG to the N-protein differed, showing a slight increase by the 1st week of the disease and a low level throughout the entire period of observation. Different dynamics of production of IgG and IgM antibodies to N-protein and RBD were noted. The amount of IgM to the N-protein increased sharply and reached a high level, while the amount of IgG increased smoothly and did not show a high level. The opposite picture was observed for antibodies to RBD. The characteristic dynamics of IgG, measured using test systems with sorbed whole virion or recombinant spike proteins, suggests duration of the disease

Key words: antibodies, seroconversion, dynamics, humoral immunity, SARS-CoV-2, COVID-19

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-160>

Введение. Инфекция, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), начавшись со вспышки в Китае в конце 2019 г., за несколько месяцев распространилась по всему миру, приобретая характер пандемии. Обнаружение РНК вируса в биологическом материале (ОТ-ПЦР в реальном времени) является стандартным лабораторным методом диагностики COVID-19. В то же время исследование гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 различными иммунохимическими методами также имеет несомненное диагностическое значение при обследовании больных COVID-19 или лиц с подозрением на инфицирование этим коронавирусом.

Цель исследования. Обнаружение антител к различным антигенам вируса SARS-CoV-2, определение сроков появления и длительности персистирования антител разного вида у пациентов при подтверждённой инфекции COVID-19.

Материалы и методы. Антитела IgG- и IgM-класса были исследованы в венозной крови 76 пациентов с подтверждённым наличием вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР и/или COVID-19 при исследовании КТ (всего 166 образцов). Из 76 пациентов 61 были обследованы в динамике (от 38 человек по 2 образца в разные сроки болезни, от 18 человек — по 3 образца, от 4 человек — по 4 образца и от 1 человека — 5 образцов, т.е. в целом от 2 до 5 точек обследования). Образцы сывороток крови были любезно предоставлены ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, где пациенты проходили лечение инфекции COVID-19 в мае 2020 г. Данные о длительности заболевания взяты из анамнеза пациента.

Определение IgG-антител к SARS-CoV-2 проводилось методом ИФА с использованием отечественных диагностических наборов с сорбированными в лунках

планшета цельновирioнным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 («SARS-CoV-2-ИФА-Вектор», ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск), рекомбинантным белком нуклеокапсида (N-белок) («ИФА анти-SARS-CoV-2 IgG», ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), рекомбинантным полноразмерным тримеризованным гликопротеином (Spike) («SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Новосибирск) или рекомбинантным белком RBDs (домен Spike-белка) («SARS-CoV-2-IgG-ИФА», ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ООО «Хема», Москва).

Для детекции IgM-антител к SARS-CoV-2 использовали отечественные наборы реагентов, основанные на непрямом варианте твердофазного ИФА с иммобилизованными в лунках антителами к IgM человека и выявлением специфических антител с помощью конъюгатов, содержащих антигены вируса, — N-белок нуклеокапсида («SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест») или RBDs (receptor binding domen рецептор-связывающий домен Spike-белка) («SARS-CoV-2-IgM-ИФА», ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ООО «Хема»; специальный конъюгат, содержащий RBDs, был любезно предоставлен производителем).

Результаты исследований выражались в виде коэффициента позитивности (КП), представляющего собой отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности, высчитываемой в каждом анализе. Интерпретация результатов: в зависимости от использованного набора положительными считались образцы с КП, превышающим 1,1–1,2; отрицательными — с КП менее 0,8–0,9. Промежуточные значения КП свидетельствовали о сомнительном или неопределённом результате («серая зона»).

Результаты. В ранние сроки наблюдения (до 4-го дня) IgM- и IgG-антитела не обнаруживались, за исключением антител обоих классов к N-белку и IgG-антител к тримеру Spike-белка. Однако необходимо отметить, что уровень IgM-антител регистрировался в районе «серой зоны» (1,0–1,1), а обнаружение IgG-антител к тримеризованному гликопротеину у 1 пациента (КП 1,7), скорее всего, свидетельствует о более раннем инфицировании.

На 5–9-й день наблюдения уже у примерно половины пациентов обнаруживались антитела как IgM, так и IgG классов, за исключением IgM-антител к RBD, которые выявлялись у трети пациентов. При этом средний уровень КП IgM-антител к N-белку составил 3,8, в то время как IgM к RBD только начинали вырабатываться (среднее значение КП чуть выше 1,2). Самый высокий уровень IgG-антител регистрировался к тримеризованному гликопротеину (5,1), а самый низкий — к N-белку (1,4).

Начиная с 10–19-го дня наблюдения вплоть до 30–39-го дня практически у всех пациентов регистрировались IgM-антитела к N-белку (КП в среднем 8,0). В то же время IgM-антитела к RBD обнаруживались не у всех (на 10–19-й

день в 73,2%, на 20–29-й день — в 79,5%, на 30–39-й — в 55,6% случаев), а КП не превышал 2,4. Все исследованные антитела класса IgG регистрировались в 92,3–100% случаев в те же сроки наблюдения, причём если КП антител к N-белку оставался на уровне 3,6–3,9, то антитела к цельному вириону и белкам шипа достигали гораздо более высоких значений (КП 9,6–14,8).

В более поздние сроки наблюдения — 40–49-й и 50–53-й дни — IgG-антитела по-прежнему обнаруживались ко всем исследованным антигенам. При этом уровень специфических IgG к N-белку оставался в пределах тех же значений (КП 3,1–3,4), к цельновирионному антигену и RBD снизился до 6,6–6,1 и 7,6–6,9 соответственно, а к тримеризованному гликопротеину продолжал оставаться высоким (КП 9,6–11,1). К 7–8-й неделе наблюдения IgM-антитела начинают исчезать из кровотока. Так, IgM-антитела к RBD выявлялись только у 25% пациентов, а к N-белку — у 50%. Необходимо отметить, что у 2 из 76 пациентов антитела вообще не вырабатывались или вырабатывались слабо. Из них у одного (пробы сыворотки крови взяты на 15-й и 22-й дни заболевания) регистрировались только специфические IgM к N-белку, а IgG-антитела ни к N-белку, ни к белкам шипа, ни к цельному вириону в эти сроки не выявлялись, а у другого пациента, от которого имелись образцы сыворотки крови, взятые только на 43-й и 53-й дни болезни, не были выявлены никакие IgM-антитела (неизвестно, были ли они в более ранние сроки болезни), а IgG-антитела (но не к N-белку) обнаруживались только на 53-й день — к цельновирионному антигену (КП 2,9), к тримеризованному гликопротеину шипа (КП 5,5) и RBD (КП 1,1).

Была отмечена различная динамика выработки IgG- и IgM-антител к N-белку нуклеокапсида и к RBD — основному домену гликопротеина шипа вируса (рисунок). И те, и другие IgM-антитела начинают обнаруживаться на 1-й неделе заболевания, однако если уровень IgM-антител к RBD не достигает высоких значений (КП оставался на уровне 1,2–3,2 со снижением к 8-й неделе до 1,6), то уровень IgM-антител к N-белку нуклеокапсида резко увеличивается за короткий промежуток времени от нулевых значений до КП 8,0 (3-я неделя заболевания). За весь срок наблюдения концентрация этих специфических IgM оставалась высокой и снизилась только к 8-й неделе до среднего значения КП 3,3. Динамика выработки специфических IgG была противоположной. Концентрация IgG-антител к RBD резко увеличивалась, начиная с 1-й недели заболевания от КП 2,4 до КП 11,1 к 5-й неделе, в то время как уровень IgG-антител к N-белку нарастал более плавно и не превышал КП 4,0. Динамика выработки IgM- и IgG-антител к N-белку нуклеокапсида согласуется с указанной в работах [1, 2].

Степень увеличения концентрации IgG-антител, измеренная с помощью наборов с сорбированными цельным вирионом или рекомбинатными белками шипа,

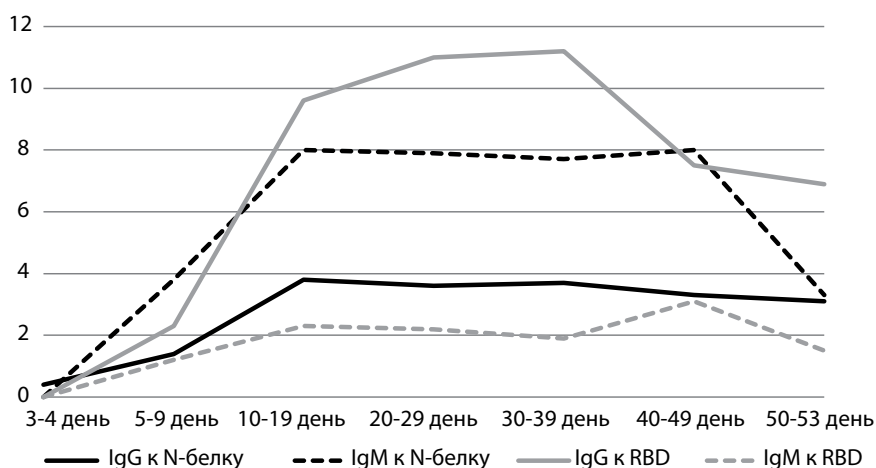
позволяет предположить продолжительность заболевания (т.е. срок от момента инфицирования), подтверждая необходимость диагностического серологического тестирования пациентов с COVID-19, в то время как уровень IgG-антител к N-белку держится на одном невысоком уровне в течение всего заболевания.

Необходимо отметить также, что наблюдалась корреляция уровней IgG-антител к цельновирионному антигену и рекомбинатным антигенам шипа (тримеризованному гликопротеину и RBD), и при выраженном ответе на вирус можно использовать для оценки противовирусного гуморального иммунитета все три варианта систем на основе ИФА. Однако разработчики считают, что система, основанная на цельновирионном антигене, может выявлять также антитела к сезонным коронавирусам, что может приводить к появлению ложноположительных результатов при анализе образцов на антитела к SARS-CoV-2. В связи с этим мы полагаем, что при низких значениях КП, зарегистрированных при использовании цельновирионной системы, необходимо проанализировать образцы в системах с сорбированными рекомбинатными антигенами.

Обнаружение IgG-антител к белкам шипа имеет большое значение в свете данных литературы о том, что именно эти антитела обладают защитной функцией при инфицировании SARS-CoV-2 и нейтрализуют действие вируса [3], а сами белки шипа рассматриваются как кандидаты при конструировании соответствующих вакцин [4, 5].

Выводы. В срок наблюдения до 5 дней в сыворотке крови пациентов с подтверждённой инфекцией COVID-19 не выявляются IgM- и IgG-антитела ко всем исследованным антигенам вируса SARS-CoV-2.

Сероконверсия как IgM-, так и IgG-антител наблюдалась в первую неделю



Средний уровень IgM- и IgG-антител к N-белку и RBD SARS-CoV-2 в различные сроки наблюдения (КП).

заболевания, что было зафиксировано при использовании всех 6 наборов реагентов, основанных на ИФА.

Динамика антител М класса к N-белку и RBD была схожей, но уровень антител отличался. Начиная обнаруживаться на 1-й неделе заболевания, IgM-антитела к RBD не достигали высоких значений, в то время как уровень IgM-антител к N-белку нуклеокапсида резко увеличивался за короткий промежуток времени от нулевых до высоких значений КП (к 3-й неделе заболевания). За весь срок наблюдения концентрация этих специфических IgM оставалась высокой и снизилась только к 8-й неделе.

Динамика IgG-антител к цельновирионному антигену и рекомбинантным антигенам шипа была схожей с максимальными значениями показателей на 4–5-й неделе наблюдения.

Динамика IgG-антител к N-белку отличалась от динамики антител к цельновирионному антигену и рекомбинантным антигенам шипа (незначительный рост концентрации к 1-й неделе и невысокий уровень в течение всего срока наблюдения — 8 недель).

Была отмечена различная динамика выработки IgG- и IgM-антител к N-белку нуклеокапсида и к RBD — основному домену гликопротеина шипа вируса. Для антител к N-белку характерно резкое увеличение и высокий уровень IgM-антител, в то время как уровень IgG-антител к N-белку нарастал более плавно и не достигал высоких значений. Для антител к RBD наблюдалась обратная картина.

Характерная динамика уровня IgG-антител, измеренная с помощью тест-систем с сорбированными цельным вирионом или рекомбинантными белками шипа (но не с N-белком), позволяет предположить продолжительность заболевания (т.е. срок от момента инфицирования), что имеет диагностическое значение.

Литература

1. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Statusreport. *Immunity*. 2020. Apr 14; 52(4): 583–589. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.007.
2. Wanbo T., Lei H., Xiujuan Z. et al. Characterization of the Receptor Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell. Mol. Immunol.* 2020. Vol. 17. P. 613–620. Epub 2020 Mar 19. doi: 10.1038/s41423-020-0400-4.
3. Juanjuan Z., Quan Y., Haiyan W. et al. Antibody response to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease. *Clin. Infect. Dis.* 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189>.
4. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020. Vol. 181(2). P. 281–292. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
5. Xiang F. Xiaorong W., Xinliang H. et al. Antibody detection and dynamic characteristics in Patients with COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Apr 19: ciaa461. doi: 10.1093/cid/ciaa461



ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО COVID-19 В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ В ПЕРИОД С 26 ФЕВРАЛЯ 2020 г. ПО 22 ИЮЛЯ 2020 г.

Я.В. Панасюк, Н.С. Чурилова, Н.В. Власенко, Д.В. Дубоделов, В.В. Клушкина, С.Н. Кузин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Изучены отдельные параметры эпидемического процесса COVID-19 в Нижегородской области за период с 26 февраля по 22 июля 2020 г. Показано, что наиболее интенсивно в эпидемический процесс были вовлечены лица возрастной категории от 42 до 65 лет, среди заболевших доля женщин оказалась больше (58,12%), чем доля мужчин (41,8%). Выявлена положительная корреляция количества заболевших COVID-19 для возрастных групп от 19 до 41 года и от 42 до 65 лет.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-COV-2, эпидемиологическая ситуация, мониторинг

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-165>

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COVID-19 IN NIZHNY NOVGOROD OBLAST DURING FEBRUARY 26, 2020 TO JULY 22, 2020

Ia.V. Panasiuk, N.S. Churilova, N.V. Vlasenko, D.V. Dubodelov, V.V. Klushkina,
S.N. Kuzin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

We studied individual parameters of the COVID-19 epidemic process in the Nizhny Novgorod region for the period from February 26 to July 22, 2020. It was shown that the most intensively involved in the epidemic process were persons of the age category from 42 to 65 years, among the sick the proportion of women was more (58,12%) than the proportion of men (41,8%). A positive correlation was found between the number of COVID-19 cases and age for the age groups from 19 to 41 years old and from 42 to 65 years old.

Key words: COVID-19, SARS-COV-2, epidemiological situation, monitoring

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-165>

Введение. Нижегородская область — один из крупнейших субъектов Российской Федерации с развитой промышленностью и сравнительно высокой плотностью населения. Сравнительный анализ эпидемиологической ситуации по COVID-19 по субъектам РФ даёт основания рассматривать Нижегородскую область как одну из территорий с относительно неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по COVID-19.

Цель исследования. Анализ динамики регистрации COVID-19 на территории Нижегородской области в период с 26.02.2020 по 22.07.2020 по данным официальной отчётности.

Материалы и методы. Официальная статистическая отчётность. Обработку данных проводили с использованием традиционных статистических методов.

Исследования биологического материала для выявления РНК SARS-CoV-2 выполняли методом ПЦР с помощью разработанного и производимого в ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора набора реагентов «Ампли-СенсCov-Bat-FL» (регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1987 от 25.03.2020).

Результаты. Согласно данным официальной статистической отчетности, за период наблюдения в Нижегородской области было зарегистрировано 20 846 случаев новой коронавирусной инфекции (650,8 на 100 тыс. населения). Гендерная пропорция заболевших COVID-19 составила 41,8% мужчин и 58,12% женщин. Средний возраст заболевших женщин составил $48,02 \pm 20,37$ года, что выше среднего возраста заболевших мужчин $44,05 \pm 20,57$ г. Рассчитанные значения величин стандартных отклонений характеризуют высокую возрастную вариабельность когорт мужчин и женщин с COVID-19.

Первый лабораторно подтвержденный случай заболевания был зарегистрирован 26.02.2020 г. у жительницы Нижнего Новгорода, вернувшейся из Италии. Предварительный диагноз был поставлен на основании результатов компьютерной томографии и в последующем подтвержден обнаружением РНК SARS-CoV-2 в лаборатории Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

В возрастной структуре заболевших COVID-19 в Нижегородской области выявлен ряд закономерностей. Вся когорта пациентов характеризовалась превалированием лиц в возрасте 42–65 лет, чей удельный вес составил 44,3%. Пациенты в возрасте 19–41 год также были активно вовлечены в эпидемический процесс, о чём свидетельствует значительный удельный вес этой группы пациентов в возрастной структуре заболевших COVID-19 — 28,0%. Существенным можно считать удельный вес пациентов 66–83 лет (14,7%). Дети были значительно меньше вовлечены в эпидемический процесс COVID-19 — 5,6% от общего числа заболевших. Люди преклонного возраста (84–100 лет) составили 2,4% от всех заболевших, но с учётом особой тяжести течения COVID-19 у людей такого возраста эту группу следует считать особо высокого риска. Среди пациентов 42–65 лет гендерная пропорция характеризовалась значительным преобладанием женщин — 62,9%/39,3% ($p < 0,05$).

Зафиксирована прямая корреляция роста возраста и количества случаев заболеваний в возрастных группах от 19 до 41 года и от 42 до 65 лет. В возрастной категории от 0 до 18 лет наблюдается отсутствие корреляции возраста и количества случаев регистрации COVID-19. В группах пациентов от 66 до 83 лет и от 84 до 100 лет отрицательный коэффициент корреляции показывает снижение количества случаев заболеваний с ростом возраста.

До 27 марта в день в среднем регистрировалось по 3 новых случая заболеваний среди вновь прибывших из-за рубежа. Период с 28 марта по 24 апреля

Динамика развития эпидемического процесса

Период	Дата начала – дата окончания	Длительность (дней)	Среднее количество заболевших в день, стандартное отклонение
Регистрация единичных случаев	26.02.2020–28.03.2020	32	$2,2 \pm 2,6$
Регистрация множественных случаев	28.03.2020–25.04.2020	28	$11,4 \pm 8,08$
Регистрация стабильно высокой заболеваемости	25.04.2020–17.07.2020	82	$223 \pm 60,9$
Спад заболеваемости	17.07.2020–22.07.2020	5	$15,6 \pm 13,2$

можно охарактеризовать как период регистрации множественных случаев и период эпидемического подъёма заболеваемости, в регионе регистрировалось в среднем по 11 новых случаев заболевания в день. С 25 апреля по 17 июля зафиксирована стабильно высокая ежедневная регистрация заболевших, среднее количество регистрируемых случаев в день — 217. 2 мая количество зарегистрированных случаев составило 520 человек. С 18 июля зафиксировано резкое снижение выявления новых случаев заболевших до 15 впервые выявленных случаев в среднем в день (таблица).

Анализ периода стабильно высокой заболеваемости (с 25.04.2020 по 17.07.2020) показал выявляемость COVID-19 выше среди женщин (удельный вес — 58% ($n = 10\ 633$), $p < 0,05$), чем среди мужчин (удельный вес — 41,9%, ($n = 7670$), $p < 0,05$). Средний возраст заболевших женщин в период с 25 апреля по 17 июля составил 49,7 лет (ст. откл. 20,43), что незначительно выше, чем значение среднего возраста мужчин 44,9 (ст. откл. 20,63). Частота госпитализаций среди мужчин и женщин различалась незначительно и составляла 26,3% случаев госпитализаций среди женщин и 27,1% случаев госпитализаций среди мужчин.

Выводы. На основании полученных данных можно отметить следующие особенности динамики распространения COVID-19 на территории Нижегородской области:

- в эпидемический процесс оказались более вовлечены женщины (58,12%), чем мужчины (41,8%);
- среди заболевших превалировала возрастная категория от 42 до 65 лет (44,32%);
- среднесуточный темп прироста с 28.03.2020 по 17.08.2020 составил 132 новых случая в сутки;
- пик регистрации новых случаев зафиксирован 02.05.2020 и составил 520 выявленных случаев в день. С 17.07.2020 прирост заметно снизился до 15 выявленных случаев в сутки.



ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ SARS-CoV-2 В ФЕКАЛИЯХ ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ДИАРЕЯМИ В ДЕБЮТЕ ЭПИДЕМИИ COVID-19

Н.В. Паркина, Т.А. Коновалова, З.Х. Далелова, Т.А. Кожакметова, С.Б. Яцышина, А.Т. Подколзин

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Ключевые слова: COVID-19, дети, инфекционные диареи

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-168>

THE PREVALENCE OF SARS-CoV-2 IN STOOL SAMPLES FROM CHILDREN WITH DIARRHEAL INFECTIONS IN THE DEBUT OF THE COVID-19 EPIDEMIC IN THE RUSSIAN FEDERATION

N.V. Parkina, T.A. Konovalova, Z.K. Dalelova, T.A. Kozhakhmetova, S.B. Yatsyshina, A.T. Podkolzin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Key words: COVID-19, children, diarrheal infections

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-168>

Введение. Вынужденное применение строгих критериев селекции, при определении показаний к обследованию на РНК SARS-CoV-2 в дебюте эпидемического подъёма COVID-19, создаёт риски существенной недооценки числа инфицированных лиц в популяции по данным регистрируемой заболеваемости [1]. Достаточно длительный период выделения SARS-CoV-2 с фекалиями пациентов, в том числе при субманифестном течении COVID-19, которое часто наблюдается у детей, позволяет использовать данный тип материала для выявления скрытой циркуляции SARS-CoV-2 на территориях и оценки объективности регистрируемых уровней заболеваемости [2]. Инфекционные диареи являются наиболее распространённой группой нозологий, надзор за которыми обеспечивает доступность материала для проведения данного мониторинга. Наряду с этим оценка распространённости SARS-CoV-2 в образцах фекалий позволяет корректнее оценить риски работы с таким материалом в лабораториях, проводящих скрининговую диагностику инфекционных диарей в период пандемии COVID-19 [3].

Цель исследования. Выявление скрытой циркуляции SARS-CoV-2 в дебюте эпидемического подъёма заболеваемости COVID-19 на отдельных территориях РФ.

Материалы и методы. В исследование были включены 267 детей с симптомокомплексом инфекционных диарей, обследованных в период с 01.03.2020

Соотношение результатов тестирования образцов фекалий от пациентов с ОКИ на наличие РНК SARS-CoV-2 с показателями регистрируемой заболеваемости на отдельных территориях

Регион	Детекция РНК SARS-CoV-2 в фекалиях детей с симптоматикой ОКИ		Регистрация COVID-19 на дату окончания сбора образцов	
	период сбора	количество тестированных/положительных образцов	количество зарегистрированных случаев	показатель заболеваемости (на 100 тыс. населения)
Нижегородская область	11.02.2020–09.03.2020	30/0	0	0,00
Республика Дагестан	13.03.2020–25.03.2020	52/0	0	0,00
Хабаровский край	08.03.2020–24.03.2020	51/0	4	0,41
Московская область	09.03.2020–02.04.2020	24/0	169	2,20
Москва	30.04.2020–11.05.2020	110/5	115900	914,18

по 12.05.2020 на территориях Москвы, Московской области, Республики Дагестан, Нижегородской области и Хабаровского края. Выявление РНК SARS-CoV-2 в образцах фекалий проводилось с использованием наборов реагентов «РИБО-преп» и «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии») в соответствии с инструкцией производителя. Данные о количестве случаев заболеваний, регистрируемых на включенных в исследование территориях РФ, получены из открытых источников [4].

Результаты. На включенных в исследование территориях, к моменту окончания сбора образцов фекалий от детей с симптомокомплексом инфекционных диарей, регистрировалось от 0 до 115900 зарегистрированных случаев COVID-19. РНК SARS-CoV-2 при скрининге образцов фекалий от детей с симптоматикой острых кишечных инфекций (ОКИ) была выявлена только в одном регионе с максимальной зарегистрированной заболеваемостью COVID-19 (таблица).

Выводы. Тестирование ограниченной выборки образцов фекалий (от 30 до 52 образцов) детей с инфекционными диареями на территориях РФ в период отсутствия официальной регистрации случаев COVID-19 не позволило выявить скрытую циркуляцию SARS-CoV-2 в популяции. Для территории Москвы в период регистрируемой заболеваемости COVID-19 на уровне 900 на 100 тыс. населения доля позитивных по содержанию РНК SARS-CoV-2 образцов фекалий детей с инфекционными диареями составила 4,5%.

Литература

1. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf
2. Gupta S., Parker J., Smits S., Underwood J., S. Dolwani. Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces — a rapid review. *Colorectal Dis.* 2020. Vol. 22(6). P. 611–620. DOI: 10.1111/codi.15138. Epub 2020 Jun 4.
3. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): interim guidance WHO/WPE/GIH/2020. [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-\(COVID-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-(COVID-19)).
4. COVID-19 pandemic data/Russia medical cases URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Template:-COVID_19_pandemic_data/Russia_medical_cases (дата обращения 19.08.2020).



РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ IgG К SARS-COV-2 СОТРУДНИКОВ МЕДИЦИНСКОГО ЦЕНТРА

Н.В. Северская, И.В. Чеботарева, Н.Г. Минаева, Н.Е. Щербакова, С.А. Иванов

Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Ключевые слова: *коронавирусная инфекция COVID-19, антитела IgG к SARS-Cov-2*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-171>

RESULTS OF TESTING SARS-COV-2 IgG ANTIBODIES AMONG THE MEDICAL CENTER EMPLOYEES

N.V. Severskaya, I.V. Chebotareva, N.G. Minaeva, N.E. Scherbakova, S. A. Ivanov

Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

Key words: *coronavirus infection COVID-19, SARS-CoV-2-IgG-antibodies*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-171>

Введение. Работники медицинских организаций имеют высокий риск инфицирования коронавирусной инфекцией COVID-19 в результате профессиональной деятельности, в связи с чем рекомендовано их регулярное обследование для выявления антител IgG к SARS-CoV-2 (Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 22.05.2020).

Цель исследования. Оценить распространённость носительства антител (АТ) IgG к SARS-CoV-2 среди сотрудников медицинского центра.

Материалы и методы. С мая по август 2020 обследовано 704 сотрудника центра (всего 782 исследования). Женщин — 608, мужчин — 96. Возраст — $47,4 \pm 13,7$ года (медиана 50 лет). Исследовали образцы сыворотки крови на наличие антител IgG к SARS-CoV-2 с помощью наборов реагентов ООО «Хема» (ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ России, РУ РЗН 2020/102019 от 30.04.2020) ($n = 450$) и АО «Вектор Бест» (РУ РЗН 2020/10388 от 18.05.2020) ($n = 332$). Положительным считался результат при коэффициенте позитивности $\geq 1,1$.

Результаты. АТ IgG к SARS-CoV-2 выявлены у 123 (17,5%) обследованных. Из них у 68 (55%) ранее выявлена РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). У остальных исследование РНК или не проводилось (15, 12%), или РНК вируса не обнаружена (40,33%). В то же время АТ IgG к SARS-CoV-2 не обнаружены у 5 человек с положительным результатом выявления РНК SARS-CoV-2 (выявленные контактные лица без клинических симптомов заболевания). У одного сотрудника при наличии

положительного результата выявления АТ IgG к SARS-CoV-2 с помощью набора реагентов «Хема» получен отрицательный результат, который не был подтверждён при исследовании набором «Вектор-Бест» (исследование РНК не проводилось).

Выводы. Распространённость наличия АТ IgG к SARS-CoV-2 среди сотрудников центра — 17,5%, из них почти у половины не было подтверждения ранее перенесённой инфекции по данным ПЦР-РВ. Наборы разных производителей могут давать разные результаты, что требует стандартизации исследования.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ИНФЕКЦИОННЫХ ЧАСТИЦ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

И.Г. Сивов, И.С. Фирсов

ООО «Инженник», Москва

Принцип получения сенсоров для обнаружения в пробах инфекционных частиц РНК вирусов предложен для диагностики инфекционных частиц SARS-CoV-2. Ранее подобная схема получения сенсора была успешно применена в отношении вируса гепатита С. Установлено, что в заведомо «положительной по коронавирусу» пробе соотношение титра РНК, определяемого в реакции ОТ-ПЦР в режиме RealTime, относится к количеству инфекционных («светящихся») центров, образующихся на клетках с сенсором примерно как 100:1.

Ключевые слова: антивирусная генетическая программа (АГП), люцифераза, 3'-концевой фрагмент РНК SARS-CoV-2

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-173>

FLECK QUANTIFICATION OF THE NUMBER OF INFECTIOUS SARS-COV-2 CORONAVIRUS PARTICLES

I.G. Sivov, I.S. Firsov

LLC «Ingenik», Moscow, Russia

The principle of obtaining sensors for detecting infectious particles of RNA viruses in samples was proposed for the diagnosis of infectious particles SARS-CoV-2. Previously, the similar sensor pattern was successfully applied in relation to the hepatitis C virus. It was founded that the ratio of the RNA titer, determined in the RT-PCR reaction in Real Time mode, refers to the number of infectious («shine») centers formed on the cell sensor culture, approximately as 100: 1, in the «coronavirus-positive» sample.

Key words: antiviral genetic program (AGP), luciferase, 3'-end fragment of SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 RNA

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-173>

Введение. Определение вирусной РНК методом ОТ-ПЦР не позволяет оценить присутствие и количество (титр) инфекционных частиц вируса SARS-CoV-2 в пробах, что отражается на оценках ситуаций в эпидемиологии и клинике. Культура клеток, стабильно наследующая антисмысловую репортёрную РНК-сенсор [1, 2], позволяет в течение суток точно определить титр инфекционных частиц в пробах. Мы провели эксперименты с вариантом АГП, у которой был высококонсервативный 3'-концевой фрагмент РНК SARS-CoV-2.

Материалы и методы. В работе использованы методы, применяемые для работы с культурами тканей (линия Vero-6). Для количественного опреде-

ления вируса использованы методы предельных разведений и титрование вируса на монослое клеток. Количественную реакцию ОТ-ПЦР в режиме Real-Time проводили с праймерами, описанными в работе [3], люцифераза от «Бионем» (Москва), активность фермента определяли с помощью набора E1483 от «Бионем» (Москва), ген люциферазы из плазмиды CMV-CLuc-MCS-NP-Puro [4].

На первом этапе переклонировали последовательность гена люциферазы в антисмысловой ориентации и пристыковывали её к 3'-концевому фрагменту SARS-CoV-2, который сохранён у более чем 1000 изолятов [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>], так, чтобы сохранить принцип функционирования АГП. На втором этапе клетки линии Vero-6 трансфецировали преципитатом ДНК, вновь полученной плазмиды и после ряда пассажей выделили стабильно наследующий вариант Vero-6 (Vero*), в цитоплазме клеток которого выявляли РНК АГП. На третьем этапе заражали полученный вариант Vero* вирусом из заведомо положительных проб (методом предельных разведений) и определяли интенсивность свечения люциферазы. Наконец, определяли количество инфекционных («светящихся») вирусных частиц на монослое клеток, окрашивая их в агарозном геле реактивом E1483.

Результаты. Более 95% «инфекционных» центров, образованных на монослое клеток, окрашивались реактивом E1483, тем самым указывая на образование центров под действием инфекционного вируса. Расхождение между «титром РНК», который определяли методом ОТ-ПЦР в режиме RealTime, и количеством инфекционных («светящихся») центров достигало 100-кратного значения 100:1 (таблица).

Результаты определения титра РНК и количество «инфекционных» центров

Пробы для анализа	Титр РНК	Количество «светящихся» центров	Соотношение РНК/ «инфекционный» центр
«Негативная»	Нет	Нет	–
«Позитивная» – без разведения	$> 10^7$	Тотально	–
«Позитивная» – разведение 10^{-2}	$\approx 10^5$	> 100	–
«Позитивная» – разведение 10^{-4}	$\approx 10^3$	12	≈ 100
«Позитивная» – разведение 10^{-5}	$\approx 10^2$	2	≈ 50
«Позитивная» – разведение 10^{-6}	$\approx 10^1$	Нет	–

Выводы. Культура клеток Vero* может быть рекомендована для практического применения, когда необходимо оценить присутствие инфекционных вирусных частиц и соотношение между ними и неинфекционными вирионами.

Литература

1. Сивов И.Г., Соболев А.Ю., Самохвалов Е.И., Сергиенко В.И. Антивирусная генетическая программа — новый тип ДНК-вакцины. *Доклады Академии наук*. 2001; (6): 834–837. Sivov I.G., Sobolev A.Y., Samochvalov E.I., Sergienko V.I. [Genetic Antiviral Program — new type of the DNA vaccines]. *Doklady Akademii nauk*. 2001; (6): 834–837. (In Russ.)
2. Патент РФ № 2159285 [Patent RF № 2159285].
3. Патент РФ № 2720713 [Patent RF № 2720713].
4. Патент РФ № 2639539 [Patent RF № 2639539].



ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ COVID-19 В ПЕРИОД МАКСИМАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПАНДЕМИИ НА ПРИМЕРЕ ОДНОГО ИЗ ИНФЕКЦИОННЫХ СТАЦИОНАРОВ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Т.В. Сташко^{1,2}

¹ГБУЗ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», Москва;

²ГБУЗ МО «Домодедовская центральная городская больница», Домодедово

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, анализ случаев госпитализаций при COVID-19

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-176>

MAIN CLINICAL AND DEMOGRAPHIC COVID-19 INDICATORS DURING THE MAXIMUM SPREAD SARS-COV-2 PANDEMIC BY THE EXAMPLE OF THE INFECTIOUS HOSPITAL IN THE MOSCOW OBLAST

T.V. Stashko^{1,2}

¹M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia;

²Domodedovo Central City Hospital, Domodedovo, Russia

Key words: new coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, analysis of hospitalizations for COVID-19

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-176>

Введение. Пандемия, вызванная SARS-CoV-2, уже прошла пик развития в большинстве регионов Российской Федерации. Однако некоторые учёные прогнозируют вторую волну подъёма заболеваемости, а значит, необходимость изучения новой коронавирусной инфекции остаётся актуальной. И для оптимизации организации медицинской помощи пациентам с COVID-19 необходимо продолжать анализировать случаи заболевания новой коронавирусной инфекцией.

Цель исследования. Продемонстрировать клинические и демографические особенности пациентов с пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, в пик распространения COVID-19 на примере одного из инфекционных стационаров в Московской области (МО).

Материалы и методы. Проведён ретроспективный анализ случаев заболевания пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, в инфекционном отделении Домодедовской центральной городской больницы (ИО ДЦГБ) в период максимального распространения COVID-19 в МО (май 2020 г.).

Результаты. В мае 2020 г. в ИО ДЦГБ госпитализировано 205 пациентов с пневмонией (100 мужчин и 105 женщин). Средний возраст поступивших

составил 55,5 (95% ДИ 53,0–58,0) года. Пациенты старше 60 лет составили 43% (95% ДИ 36,2–49,8). Удельный вес лиц старше 80 лет — 8% (95% ДИ 4,3–11,7). Доля тяжёлых форм составила 29,3% (95% ДИ 23,1–35,5), в кислородной поддержке нуждалось 52,7% (95% ДИ 45,9–59,5), на ИВЛ находилось 13,2% (95% ДИ 8,6–17,8).

У большинства пациентов отмечались тяжёлые сопутствующие заболевания (70,7%): 43,4% — гипертоническая болезнь, 20,5% — ишемическая болезнь сердца (в том числе 4% после перенесённого инфаркта миокарда), 7,3% — нарушения мозгового кровообращения (3,4% — инфаркт мозга), 11,7% — ожирение 2–3-й степени, 4,9% — сахарный диабет 1 типа, 1,5% — хронические заболевания желудочно-кишечного тракта. Схемы лечения корректировались в соответствии с сопутствующей нозологией. Средний койко-день в мае составил 11,3 (95% ДИ 10,5–12,1).

Выводы. В мае 2020 г. в ИО ДЦГБ маршрутизировались пациенты с пневмонией, требующие оказания неотложной помощи из-за тяжести COVID-19 или коморбидных заболеваний. Не выявлено существенных гендерных отличий среди госпитализированных пациентов. Весомую часть составили пациенты старше 60 лет — 43%, большинство имели сопутствующую патологию — 70,7%. Более половины пациентов нуждались в кислородной поддержке.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ IgM И IgG АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-COV-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

А.П. Топтыгина, Л.И. Новикова, М.А. Смердова, С.С. Бочкарева, А.В. Алешкин

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, IgM-, IgG-антитела

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-178>

DETERMINATION OF IgM AND IgG ANTIBODIES TO THE SARS-COV-2 VIRUS IN THE SERUM OF CONVALESCENTS BY DIFFERENT METHODS AND KITS FROM DIFFERENT MANUFACTURERS

A.P. Topygina, L.I. Novikova, M.A. Smerdova, S.S. Bochkareva, A.V. Aleshkin

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

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, IgM-, IgG-antibodies

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-178>

Введение. 2020 год потряс человечество пандемией нового заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2. Вирус поразил уже более 27 млн человек во всём мире. Необычной чертой данного заболевания является сильная вариабельность клинических проявлений: от бессимптомного инфицирования до крайне тяжёлых, требующих интенсивной терапии и нередко заканчивающихся смертью пациентов. Оказалось, что у перенёсших COVID-19 не всегда вырабатываются защитные антитела (АТ), что создаёт угрозу повторного инфицирования. В связи с этим весьма актуальным стал вопрос о достоверном определении АТ к вирусу SARS-CoV-2. Был создан целый спектр наборов реагентов, предназначенных как для иммуноферментного, так и для хемилюминисцентного методов определения АТ к вирусу SARS-CoV-2, которые различаются использованными в них антигенами вируса — от цельновирионных вариантов до отдельных вирусных белков и даже их активных центров.

Цель исследования. Сопоставить результаты определения АТ к вирусу SARS-CoV-2, полученные при использовании нескольких сертифицированных в РФ наборов реагентов.

Материалы и методы. Определение АТ проводили в сыворотках крови 82 взрослых, перенёсших лабораторно подтверждённый COVID-19, на разных сроках от начала заболевания. Использовали наборы реагентов производства

ГНЦ ВБ «Вектор», РФ (IgG, цельновирионный антиген) и АО «Вектор-Бест», РФ (IgM, антиген — N-белок нуклеокапсида и IgG, антиген — трёхмерный Spike-белок), метод ИФА и систему «Mindray», КНР (IgM и IgG), хемилюминесцентный метод.

Результаты. При использовании наборов производства «Вектор» и «Вектор-Бест» IgG-АТ были обнаружены у 81 человека (98,78%), совпадение результатов названных тестов (метод ИФА) составило 98,56%. При использовании системы «Mindray» IgG-АТ были выявлены у 78 человек (95,12%), совпадение результатов с полученными при применении набора «Вектор» составило 93,9%, набора «Вектор-Бест» — 96,34%. АТ IgM при применении набора «Вектор-Бест» были обнаружены у 42 человек (51,22%), в системе «Mindray» — у 35 человек (42,68%). Совпадение выявляемости АТ IgM методом ИФА и хемилюминесцентного метода составило 92,68%.

Выводы. Можно заключить, что все использованные реагенты продемонстрировали высокий процент совпадения результатов и пригодны для выявления АТ к вирусу SARS-CoV-2 у лиц, перенёсших COVID-19.



ФОРМИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К SARS-CoV-2 В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ

Т.А. Чеканова, В.Г. Акимкин, А.В. Каленская, Т.В. Тыргина, Е.В. Тиванова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В Центре молекулярной диагностики ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора с 22 мая по 28 августа 2020 г. исследованы 49 813 сывороток крови лиц без признаков инфекционного заболевания на наличие IgG к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2. Динамика встречаемости серопозитивных лиц оценивалась по декадам. Максимальная серопревалентность отмечена на конец мая. Показатели серопревалентности с 21 июня по 28 августа изменялись незначительно (максимальные значения, около 17%, отмечены с 1 по 20 июля), что согласовывалось с замедлением числа регистрации новых случаев COVID-19 в Московском регионе.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, IgG, нуклеокапсидный белок, серопревалентность

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-180>

FORMATION OF POPULATION IMMUNITY TO SARS-CoV-2 IN THE MOSCOW REGION

T.A. Chekanova, V.G. Akimkin, A.V. Kalenskaya, T.V. Tyrgina, E.V. Tivanova

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

49 813 sera from persons without clinical symptoms of infectious diseases were tested for IgG to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 at the Center for Molecular Diagnostics (Central Research Institute of Epidemiology) from May 22 to August 28, 2020. The dynamics of the incidence of seropositive persons was assessed by decades. The maximum seroprevalence was noted at the end of May. Seroprevalence indicators changed slightly from June 21 to August 28 (maximum values, about 17%, were noted from July 1 to July 20), which was consistent with the slowdown in the number of new cases of COVID-19 in the Moscow region.

Key words: SARS-CoV-2, IgG, nucleocapsid protein, seroprevalence

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-180>

Введение. Изучение особенностей формирования популяционного иммунитета в ответ на инфицирование вирусом SARS-CoV-2 является актуальным исследованием, необходимым для мониторинга и прогнозирования эпидемиологической ситуации по распространению новой коронавирусной инфекции COVID-19. Регистрация специфических антител класса G к SARS-CoV-2 у населения на протяжении длительного срока наблюдения позволит проанализировать динамику сохранения маркеров гуморального иммунного ответа. В настоящее время мировым научным сообществом развёрнуты многочисленные исследования, направленные на выяснение протективных

свойств специфических антител, сроков их сохранения после перенесённого заболевания, что важно не только для понимания формирования иммунной прослойки населения, но и для выбора стратегии разработки эффективных терапевтических и профилактических препаратов.

В Российской Федерации первые наборы реагентов, предназначенные для выявления антител к SARS-CoV-2 в сыворотке/плазме крови человека, были зарегистрированы уже в апреле этого года. С мая число получивших одобрение Росздравнадзора наборов реагентов подобного назначения только росло. Доступность таких диагностикумов на отечественном рынке подтолкнула к необходимости начала проведения скрининговых исследований для выявления специфических антител у населения. Такой крупный мегаполис, как Москва, а также Московская область, население которых больше всего пострадало от новой коронавирусной инфекции COVID-19 в РФ, представляют собой важные субъекты для эпидемиологического исследования, целью которого является анализ формирования популяционного иммунитета к SARS-CoV-2.

Цель исследования. Изучение встречаемости специфических антител класса G к SARS-CoV-2 у населения Москвы и Московской области на протяжении 3-месячного срока наблюдения.

Материалы и методы. Проведен анализ тестирования на наличие специфических антител класса G к SARS-CoV-2 в 49 813 образцах сывороток крови лиц без выраженных клинических признаков инфекционного заболевания, самостоятельно обратившихся в Центр молекулярной диагностики (ЦМД) ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора для получения медицинской услуги в период с 22 мая по 28 августа 2020 г. Доля лиц женского пола составила 54,7%, мужского — 45,3%. Доля несовершеннолетних лиц — 4,1%.

В работе использованы зарегистрированные в РФ следующие наборы реагентов:

- набор реагентов для анализа сыворотки или плазмы крови человека класса G к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа «ИФА анти-SARS-CoV-2 IgG» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) для исследования биологического материала в период с 22 мая по 20 июня 2020 г.;

- набор реагентов «Architect SARS-CoV-2 IgG» для выявления IgG к нуклеокапсидному антигену SARS-CoV-2 методом иммунолюминесцентного анализа, выполняемый на оборудовании ARCHITECT® (ООО «Эбботт Лэбораториз») в период с 21 июня по 28 августа 2020 г.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены данные встречаемости IgG к нуклеокапсидному антигену SARS-CoV-2 в сыворотках крови исследуемых лиц. Пограничные результаты (серая зона), которые были получены при использовании набора «ИФА анти-SARS-CoV-2 IgG» производства ФБУН ГНЦ

ПМБ, Оболенск (всего — 1652), не принимались во внимание при вычислении доли положительных образцов. Суммарная доля взрослых лиц с наличием IgG к SARS-CoV-2 за весь период наблюдения составила 15,8%, также выявлено 10,7% серопозитивных несовершеннолетних.

Известно, что антитела класса G к нуклеокапсидному антигену SARS-CoV-2 зачастую определяются уже спустя неделю после инфицирования и достигают максимальной концентрации к 3-й неделе [1, 2]. Следовательно, в популяции максимальная серопревалентность должна наблюдаться вскоре после пика регистрации циркуляции возбудителя и новых случаев заболевания. Наши исследования показали, что число серопозитивных лиц было наиболее высоким в самом начале тестирования (конец мая). В начале–середине мая в Московском регионе отмечалась максимальная регистрация новых случаев заболевания COVID-19 (<https://coronavirus-monitor.ru/coronavirus-v-moskve/>). Серопревалентность в период с 21 июня по 28 августа, оценённая с использованием наборов реагентов «Architect SARS-CoV-2 IgG», изменялась незначительно (максимальные значения — около 17% — определялись с 1 по 20 июля), что согласовывалось с замедлением числа регистрации новых случаев заболевания. Полученные нами данные также свидетельствуют о небольшом сроке сохранения в кровотоке специфических антител класса G к нуклеокапсидному антигену, поскольку с течением времени иммунная прослойка не увеличивалась. В исследованиях ряда авторов [3, 4] показано, что уровень циркуляции в крови IgG к SARS-CoV-2, в частности, к нуклео-

Встречаемость IgG к нуклеокапсидному антигену SARS-CoV-2 в сыворотках крови населения Московского региона (по данным ЦМД ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора)

Период исследования	Всего исследовано сывороток	Выявлено положительных образцов	Доля положительных образцов (%)
22–31 мая	6538	1747	26,7
1–10 июня	8827	1110	12,6
11–20 июня	7251	768	10,6
21–30 июня	5524	866	15,7
1–10 июля	6269	1075	17,1
11–20 июля	3955	671	17,0
21–31 июля	3901	535	13,7
1–10 августа	2333	330	14,1
11–20 августа	3006	402	13,4
21–28 августа	2209	295	13,4
Всего	49813	7799	15,7

капсидному антигену, был минимальным уже спустя 3 мес. после перенесённого заболевания.

Выводы. Замедление динамики прироста АТ IgG к SARS-CoV-2 в популяции и даже его снижение согласуется с текущей эпидемиологической ситуацией в регионе (на конец августа 2020 г.). Необходимо дальнейшее изучение особенностей формирования популяционного иммунитета, расширение протокола исследования сывороток крови не только на наличие антител к нуклеокапсидному белку, но и к другим иммуногенным антигенам вируса разных классов, и прежде всего АТ IgA, с оценкой сроков их сохранения в кровотоке.

Литература

1. Burbelo P.D., Riedo F.X., Morishima C. *et al.* Detection of nucleocapsid antibody to SARS-CoV-2 is more sensitive than antibody to spike protein in COVID-19 patients. *MedRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.20.20071423. Preprint.
2. Sun B., Feng Y., Mo X. *et al.* Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging Microbes and Infections*. 2020; 1: 940–948. DOI: 10.1080/22221751.2020.1762515
3. Long Q.X., Tang X.J., Shi Q.L. *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* 2020; 26(8):1200–1204. DOI: 10.1038/s41591-020-0965-6.
4. Shu H., Wang S., Ruan S. *et al.* Dynamic changes of antibodies to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients at early stage of outbreak. *Virologica Sinica*. 2020; 27; 1–8. DOI: 10.1007/s12250-020-00268-5



ОСОБЕННОСТИ РОСТА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19, ОРВИ, ГРИППОМ И ПНЕВМОНИЕЙ В РОССИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИМАТО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ПЛОТНОСТИ НАСЕЛЕНИЯ

Н.Ю. Пшеничная¹, И.А. Лизинфельд¹, Г.Ю. Журавлев¹, Н.С. Морозова²

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

Ключевые слова: COVID-19, острые респираторные заболевания, внебольничная пневмония, географические аспекты, плотность населения

CHARACTERISTICS OF INCIDENCE RATE OF COVID-19, ACUTE RESPIRATORY DISEASES, INFLUENZA AND COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA IN RUSSIA ACCORDING TO CLIMATE, GEOGRAFICAL ASPECTS AND POPULATION DENSITY

N.Yu. Pshenichnaya¹, I.A. Lizinfeld¹, G.Yu. Zhuravlev¹, N.S. Morozova²

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²Federal Budgetary Health Institution «Federal Center of Hygiene and Epidemiology» of The Federal Office for Inspectorate in The Field of Customers and Human Well-Being Protection, Moscow, Russia

Key words: COVID-19, acute respiratory diseases, community acquired pneumonia, influenza, geographical aspects, population density

Введение. В разных регионах Российской Федерации (РФ) отмечены различия в эпидемическом процессе COVID-19, что, возможно, связано с географическим расположением и плотностью населения.

Цель исследования. Изучить рост заболеваемости респираторными инфекциями в 2020 г. в сравнении с 2016–2019 гг. в РФ в зависимости от географического расположения и плотности населения.

Материалы и методы. Ретроспективный анализ заболеваемости COVID-19, ОРВИ, гриппом и пневмонией за первое полугодие 2020 г. в сравнении с тем же периодом в 2016–2019 гг. в РФ на основании данных мониторинга Роспотребнадзора. Оценивались географические и климатические параметры с применением методов регрессионного анализа.

Результаты. Рост уровня заболеваемости в 2020 г. в сравнении с 2016–2019 гг. в 43 из 85 субъектов РФ составил 10–50%; в 35 — 50–100%.

Наибольшее превышение наблюдалось в Республике Бурятия — 107,61%, Забайкальском крае — 134,09%, Республике Тыва — 166,34%, Калининградской области — 1023,41%, Республике Алтай — 1212,78%, Республике Дагестан — 2030,27%.

При рассмотрении роста заболеваемости в субъектах РФ с учётом плотности населения в них была получена слабая положительная корреляция ($r = 0,26$).

Степень корреляционной зависимости между процентом прироста заболеваемости в первом полугодии 2020 г. и плотностью населения в регионах была слабо отрицательной ($r = -0,03$).

При расчётах влияния на уровень заболеваемости экологической ситуации была получена слабая взаимосвязь ($r = 0,26$). Установлена умеренная обратная связь между выраженностью отрицательных температур в зимний период и уровнем заболеваемости ($r = -0,51$).

Выводы. Географическое расположение субъектов РФ, граничащих с КНР, ЕС и Ближним Востоком, влияло на прирост заболеваемости и составило 107,61–2030,27%. Плотность населения слабо взаимосвязана с уровнем заболеваемости COVID-19 и не взаимосвязана с общим ростом заболеваемости респираторными инфекциями.



ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ПАЦИЕНТОВ г. САРАТОВА И САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.А. Чумачкова¹, С.А. Портенко¹, Е.С. Казакова¹, О.В. Кедрова¹, С.А. Щербакова¹,
Т.Л. Вознюк², И.И. Крупинская³, Р.Н. Стешенко⁴

¹ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов;

²ГУЗ «Саратовская детская инфекционная клиническая больница №5», Саратов;

³ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница №1 имени Ю.Я. Гордеева», Саратов;

⁴ГУЗ «Областная клиническая больница», Саратов

Целью исследования явилось выявление эпидемиологических особенностей течения внебольничных пневмоний среди пациентов г. Саратова и Саратовской области в период эпидемии новой коронавирусной инфекции. Проанализирована медицинская документация 129 пациентов различных возрастов с подтверждённым диагнозом «внебольничная пневмония», находившихся на стационарном и амбулаторном лечении. Исследованием установлено преобладание пневмоний, вызванных COVID-19, по сравнению с пневмониями, вызванными другим этиологическим агентом, закономерность выявления лёгких, среднетяжёлых и тяжёлых форм заболевания от момента появления первых признаков болезни. Определён наиболее информативный метод диагностики — компьютерная томография органов грудной клетки. Проанализирована тяжесть течения воспалительного процесса в лёгких в зависимости от возраста заболевшего, пола, наличия сопутствующих хронических заболеваний.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, новая коронавирусная инфекция, тяжесть течения

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-186>

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF THE COURSE OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN PATIENTS OF THE CITY OF SARATOV AND SARATOV OBLAST

Е.А. Chumachkova¹, S.A. Portenko¹, E.S. Kazakova¹, O.V. Kedrova¹, S.A. Shcherbakova¹,
T.L. Voznyuk², I.I. Krupinskaya³, R.N. Steshenko⁴

¹Russian Research Antiplague Institute Microbe, Saratov, Russia;

²State Healthcare Institution «Saratov Children's Infectious Diseases Clinical Hospital No. 5», Saratov, Russia;

³State Healthcare Institution «Saratov City Clinical Hospital No. 1 named after Yu.Ya. Gordeev», Saratov, Russia;

⁴State Healthcare Institution «Regional Clinical Hospital», Saratov, Russia

The aim of the study was to identify the epidemiological features of the course of community-acquired pneumonia among patients in the city of Saratov and the Saratov region during the epidemic of a new coronavirus infection. The medical records of 129 patients of various ages with a confirmed diagnosis of community-acquired pneumonia, who were on inpatient and outpatient treatment, were analyzed. The study established the predominance of pneumonia caused by

COVID-19, compared to pneumonia caused by other etiological agents, and the pattern of identification of mild, moderate and severe forms of the disease from the moment the first signs of the disease appear. The computed tomography of the chest organs was proved to be the most informative diagnostic method. The severity of the inflammatory process in the lungs was analyzed depending on the age of the patient, gender, and the presence of concomitant chronic diseases.

Key words: community-acquired pneumonia, new coronavirus infection, severity

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-186>

Введение. Несмотря на стабилизацию эпидемиологической ситуации по COVID-19 в России, внебольничные пневмонии в структуре больных, поражённых новой коронавирусной инфекцией, занимают значительную долю. В Российской Федерации удельный вес больных COVID-19 с воспалением лёгких на 01.09.2020 составил 22,5%. Среди жителей Саратовской области темпы прироста новых случаев COVID-19 выше среднероссийских показателей, к началу сентября прирост заболеваемости за сутки составил 0,8 против 0,5 в среднем по стране. Больные COVID-19 с осложнениями в виде внебольничных пневмоний в области регистрируются ежедневно, общее число таких больных с начала пандемии составило 8249 (на 01.09.2020).

Цель исследования. Выявление эпидемиологических особенностей течения внебольничных пневмоний среди пациентов г. Саратова и Саратовской области в период эпидемии новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы. Для оценки групп населения и факторов риска развития патологического процесса в лёгочной ткани, вызванных SARS-CoV-2, применён эпидемиологический метод. Для эпидемиологического анализа использованы данные медицинской документации пациентов (история болезни стационарного больного, медицинская карта амбулаторного больного). Методами инструментальной диагностики пневмоний явились: рентгенография органов грудной клетки (44,9%), компьютерная томография органов грудной клетки (КТ) (50,4%) и флюорография (4,7%). Цифровая флюорография была применена при обследовании пациентов в условиях поликлиник.

Результаты. Исследования проведены в период с 23.06. по 01.09.2020 г. среди 129 пациентов клиник г. Саратова и Саратовской области с подтверждённым диагнозом «внебольничная пневмония» различной степени тяжести до начала этиотропного лечения. В исследуемую группу вошли взрослые — 110 человек (85,3%), из них поступившие на стационарное лечение — 92 человека, получавшие амбулаторное лечение — 18 человек, и дети в возрасте до 18 лет — поступившие на стационарное лечение 19 человек (14,7% от всех обследованных). Пациенты со среднетяжёлыми и тяжёлыми формами получали лечение в стационаре, больные с лёгкой формой заболевания лечились на дому, за исключением одного ребёнка, который с диагнозом

Распределение больных с маркерами и без маркеров возбудителя COVID-19 по тяжести состояния

Тяжесть состояния	Больные с маркерами возбудителя COVID-19	Выявление РНК SARS-CoV-2	Обнаружение IgM	Обнаружение IgG	Обнаружение IgG и IgM	Доля больных с маркерами COVID-19	Доля больных без маркеров COVID-19
Лёгкая форма	8	6	3	1	3	10%	18%
Средне-тяжёлая форма	58	54	1	2	5	72,5%	70%
Тяжёлая форма	14	11	3	1	3	17,5%	12%
Всего больных	80	71	7	4	11	100%	100%

«внебольничная верхнедолевая пневмония, лёгкое течение» был госпитализирован.

На первом этапе биологический материал 129 человек исследовали на наличие маркеров возбудителя COVID-19. По результатам исследований у 80-ти (62,0% от всех обследованных) выявлены маркеры возбудителя COVID-19, из них у 71 человека методом ПЦР обнаружена РНК SARS-CoV-2 нового коронавируса, у 22 человек в иммуноферментном анализе обнаружены антитела к COVID-19.

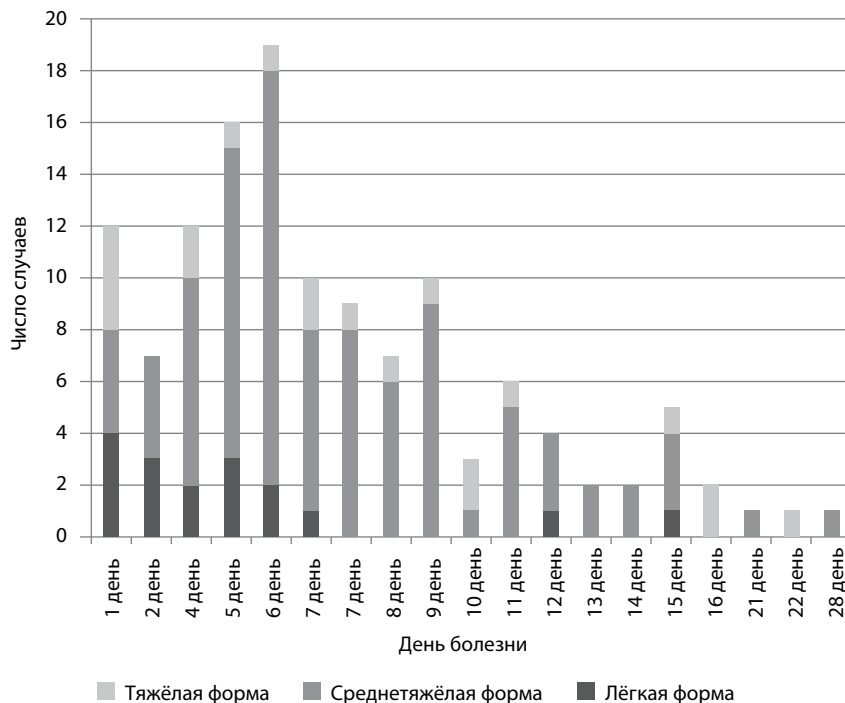
При анализе тяжести состояния больных (таблица) отмечается преобладание доли тяжёлого течения пневмоний, вызванных COVID-19 (17,5%), по сравнению с пневмониями, вызванными другим этиологическим агентом (12%). Доля лёгких форм, напротив, выше при пневмониях, вызванных не COVID-19 (18%), чем при пневмониях, вызванных COVID-19 (10%). Удельный вес среднетяжёлых форм пневмоний с COVID-19 и без COVID-19 — равный (72,5% и 70% соответственно).

Лица с подтверждённым COVID-19 в 84,5% случаях не могли подтвердить контакт с больным, что свидетельствует о неконтролируемой передаче инфекции без прослеживания эпидемиологической связи случаев, характерной для IV фазы развития эпидемического процесса [1]. Лишь 15,5% больных указывали на контакт с больными COVID-19 по месту проживания либо по месту работы.

Среди обследованных чаще всего пневмония диагностировалась в первые девять дней заболевания (рисунок), пик выявляемости приходится на 5-е сутки от момента появления первых признаков болезни (19 больных). Лёгкие формы заболевания установлены у пациентов, обратившихся за медицинской помощью в первые шесть дней. Среднетяжёлое проявление болезни характерно у лиц,

обратившихся в более поздние сроки, — с 3 по 9-й дни болезни. Закономерность выявления тяжёлых форм не установлена, так как единичные случаи заболевания с тяжёлым течением регистрировались в разные дни болезни: в первые сутки (4 больных) и далее по одному–двум случаям вплоть до 22-го дня болезни. Тяжёлая форма, зарегистрированная в первый день появления признаков болезни, может свидетельствовать о стремительном развитии патологического процесса в лёгочной ткани, истощении иммунной системы организма, наличии сопутствующих хронических заболеваний.

Для участия в программе отбирались больные всех возрастов. Самому молодому пациенту на момент заболевания и обследования исполнилось три месяца, самому пожилому — 92 года. Наибольшее число больных наблюдается в возрастной группе старше 65 лет (40,3%), в которой имелись фоновые и сопутствующие хронические заболевания, что усугубляло течение патологического процесса. При анализе данных можно сделать вывод, что пожилые люди с хроническими заболеваниями более восприимчивы к COVID-19 и имеют высокую вероятность развития тяжёлой и критически тяжёлой инфекции. В данном исследовании половина пациентов с тяжёлой



Ежедневная динамика выявляемости пневмоний по степени тяжести

формой заболевания (10 человек) были лица старше 65 лет, что согласуется с международным опытом [2].

Распределение по полу не одинаково. В анализируемой группе доля женщин составила 58,1% (75 человек), мужчин — 41,9% (54 человека). В возрасте до 50 лет чаще болеют мужчины, старше 50 лет — женщины. Среди лиц старше 65 лет женщин заболело в 2,5 раза больше мужчин (37 пациентов женского пола против 15 пациентов мужского пола). Это может быть связано с демографической ситуацией в Саратовской области: по данным Федеральной службы государственной статистики на 1 января 2019 года, в области среди лиц старше трудоспособного возраста (женщины 55 лет и старше, мужчины 60 лет и старше) женщин насчитывается в 2,3 раза больше, чем мужчин [3].

Воспаление лёгочной ткани в основном носило полисегментарный характер, доминировал двусторонний процесс в 65,9% (85 случаев), поражение в одном лёгком отмечено в 34,1% (44 случаев). Наиболее частым диагностическим признаком пневмоний, вызванных новым коронавирусом, является выявление интерстициальных изменений по типу «матового стекла» при КТ, доля которого в данном исследовании составляла 69,2%, выявлено у 45 больных из 65, обследованных методом КТ. По литературным данным [4], при пневмониях, вызванных SARS-CoV-2, прогрессирующий воспалительный процесс затрагивает стенки альвеол и соединительную ткань паренхимы, с возможной вторичной внутриальвеолярной экссудацией и исходом в фиброзную перестройку лёгочных структур. Заболевание сопровождается усиливающейся одышкой, сухим или с незначительным влажным кашлем, болью в груди, субфебрилитетом, сердечно-лёгочной недостаточностью. Все перечисленные симптомы в той или иной степени наблюдались у обследуемых пациентов. Сатурация кислорода в крови ниже 95% отмечена у 32 тяжёлых и среднетяжёлых больных (24,8% от обследованных), у семи выявлены осложнения в виде одно- и двустороннего плеврального выпота, междолевого плеврита, ателектаза лёгкого, гидроторакса.

Выводы. В результате проведённых исследований больных с внебольничной пневмонией установлено следующее.

1. Патологический процесс в лёгочной ткани в виде пневмоний развивался в первые девять дней от начала заболевания, пик выявляемости приходится на 5-е сутки. Лёгкие формы заболевания чаще диагностируют в первые дни болезни, среднетяжёлые — с 3 по 9-й дни болезни, при тяжёлых формах чёткой закономерности не выявлено.

2. Пневмонии, вызванные новым коронавирусом, протекают тяжелее, чем пневмонии, вызванные другим этиологическим агентом. Среди больных с пневмониями, вызванных SARS-CoV-2, преобладают среднетяжёлые формы (72,5%), реже — тяжёлые (17,5%) и лёгкие (10%).

3. Риск развития внебольничной пневмонии увеличивается с возрастом, при наличии сопутствующей и хронической патологии. Женщины болеют чаще мужчин (58,1% против 41,9% соответственно).

4. Наиболее информативным методом диагностики является КТ органов грудной клетки, наиболее показательным — интерстициальные изменения по типу «матового стекла», выявлено у 69,2% пациентов.

Литература

1. В.В. Кутырев, А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, В.А. Сафронов, И.Г. Карнаухов, А.В. Иванова, С.А. Щербакова. Эпидемиологические особенности новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Сообщение 1: модели реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020 (1): 6-13.
2. Электронный ресурс. Дата обращения 09.09.2020 г. <https://www.cebm.net/covid-19/global-covid-19-case-fatality-rates/>
3. Zhou Y., Guo S., He Y. et al. COVID-19 Is Distinct From SARS-CoV-2-Negative Community-Acquired Pneumonia. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020;10:322.
4. Электронный ресурс. Дата обращения 09.09.2020 г. http://srtv.old.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_ts/srtv/ru/statistics/population/7e054d0041366b1d8790e7367ccd0f13.
5. Beuy Joob 1 , Viroj Wiwanitkit. Pulmonary Pathology of Early Phase 2019 Novel Coronavirus Pneumonia



ИЗМЕНЧИВОСТЬ SARS-COV2 КАК ФАКТОР ПОТЕРИ КОНТРОЛЯ НАД РАСПРОСТРАНЕНИЕМ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.О. Якимова, И.В. Чеботарёва, Д.Ю. Кирюшина, И.Л. Ершова, Л.В. Любина, Н.М. Липунов, Г.П. Безяева, Л.В. Панарина, В.И. Киселёва

МРНЦ им А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск

Ключевые слова: SARS-Cov2, диагностика, мутации, изменчивость вируса

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-192>

VARIABILITY OF SARS-COV2 AS A FACTOR OF CONTROL LOSS OVER THE DISTRIBUTION OF CORONAVIRUS INFECTION

A.O. Yakimova, I.V. Chebotareva, D.Yu. Kiryushina, I.L. Ershova, L.V. Lyubina, N.M. Lipunov, G.P. Bezyaeva, L.V. Panarina, V.I. Kiseleva

FSBI NMRRC of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

Key words: SARS-Cov2, diagnosis, mutations, variability of the virus

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-192>

Введение. Своевременная изоляция носителей SARS-Cov2 играет важную роль в сдерживании распространения коронавирусной инфекции. В связи с этим необходимо иметь возможность детектировать наличие РНК SARS-Cov2 в биоматериале пациентов, невзирая на генетическую изменчивость вируса.

Цель исследования. Проанализировать динамику частоты встречаемости носителей мутантных вариантов SARS-Cov2 среди обследованных носителей SARS-Cov2 в г. Обнинске в мае–июле 2020 г.

Материалы и методы. В анализ взяты результаты обследования лиц методом ОТ-ПЦР в реальном времени, полученные с использованием тест-системы «SARS-Cov2/SARS-Cov» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в течение 11 недель (с 13 мая по 27 июля 2020 г.), по 575 ± 76 человек/неделю. Выбор тест-системы обусловлен возможностью детектировать присутствие РНК SARS-Cov2 в пробе одновременно по двум генам (N и E). Выявление сигнала только по одному из этих генов указывает на то, что донор биоматериала является носителем мутантного по второму гену варианта SARS-Cov2, причём мутация затронула амплифицируемую тест-системой область этого гена. Долю пациентов, положительных по результатам теста на наличие РНК SARS-Cov2 в % от числа обследованных лиц, и долю положительных результатов с мутацией в % от общего числа положительных результатов оценивали дифференцированно по неделям.

Результаты. На фоне статистически значимого снижения ($p=0,0258$) доли положительных пациентов (с 20% в середине мая до 1,6–3,6% конце июля) на-

блюдается статистически значимое экспоненциальное увеличение ($p=0,0400$) доли положительных результатов с мутацией в одном из генов SARS-Cov2 (с 8,1% в середине мая до 37,5–50% в конце июля). Следует отметить, что мутационный процесс может затрагивать различные (в том числе консервативные) участки вирусного генома, что постепенно приведёт к снижению чувствительности разработанных ранее тест-систем для выявления РНК SARS-Cov2. Примечательно, что выявленные нами мутантные варианты SARS-Cov2 в пробах не всегда удавалось детектировать рядом других тест-систем.

Выводы. Полученные данные указывают на постепенное увеличение распространения мутантных вариантов SARS-Cov2 в популяции и поднимают вопрос о необходимости регулярно оптимизировать тест-системы с учётом изменчивости вирусного генома для предотвращения потери контроля над распространением коронавирусной инфекции.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ



ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССОВ М И G К SARS-COV-2

Ю.А. Акиншина, С.С. Марданлы

ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ, Covid-19, SARS-CoV-2, новая коронавирусная инфекция

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-194>

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF IgM AND IgG TO SARS-COV-2

Yu.A. Akinshina, S.S. Mardanly

ZAO «ECOLab», Electrogorsk, Russia

Key words: immunochromatographic analysis, LFIA, Covid-19, SARS-CoV-2, new coronavirus infection

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-194>

Введение. В случаях отрицательного результата ОТ-ПЦР в диагностике COVID-19 необходимую информацию возможно получить при использовании методов обнаружения специфических антител, среди которых особое место занимают иммунохроматографические (ИХА) экспресс-тесты.

Цель исследования. Разработка и апробация на биологическом материале ИХА тест-системы для качественного дифференцированного выявления IgM/IgG к SARS-CoV-2 «ИХА-COVID-19-IgM/IgG».

Материалы и методы. Для изготовления ИХА теста использовались моноклональные антитела мыши (МоАт) к IgM («Имтек») для зоны «IgM», МоАт к IgG человека («Имтек») — для зоны «IgG» и козы антигена к IgG мыши (ООО «Биосан») — для зоны контроля. Для изготовления специфического конъюгата с наночастицами коллоидного золота (НКЗ) использовали рекомбинантные антигены SARS-CoV-2 (MyBioSource). Процедура ИХА: в отверстие тест-кассеты «S» вносили 10 мкл пробы, в отверстие «B» — 2 капли буферного раствора. Результат анализа визуально контролировали через 10 мин.

ИФА-тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (ПУ № РЗН 2020/10388) и «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (ПУ № РЗН 2020/10389) («Вектор-Бест»).

Исследуемые образцы. 400 сывороток с известным статусом в ИХЛА разделили на 4 группы: I группа ($n = 200$): IgM–/IgG–; II группа ($n = 91$): IgM–/IgG+; III группа ($n = 39$): IgM+/IgG–; IV группа ($n = 70$): IgM+/IgG+.

Результаты. При исследовании проб I группы отрицательный результат ИХА по IgM получили в 189 (94,5%) случаях; по IgG — в 181 (90,5%). Из проб II группы результаты ИХА совпали в 83 (91,2%) случаях. При исследовании проб III группы результаты экспресс-теста показали отсутствие IgM в 38 (97,4%) образцах. При исследовании их в ИФА в 37 пробах антител обнаружено не было. Это объясняется особенностями динамики специфических антител при COVID-19 (одновременное IgM и IgG). При исследовании образцов IV группы совпадения результатов по IgM составили 87,1%, по IgG — 82,9%. В целом чувствительность ИХА для выявления специфических антител составила 87,1%.

Выводы. Экспресс-тесты — полезный инструмент диагностики COVID-19. Комбинация методов ОТ-ПЦР и ИХА может дать дополнительное представление о стадии заболевания и иммунном статусе пациента при коронавирусной инфекции.



РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *RRS*, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА К АМИНОГЛИКОЗИДАМ

А.В. Бородулин, Т.А. Бондаренко, В.В. Борунова, Р.И. Луданный

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, аминогликозиды, *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-196>

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC KIT FOR DETECTION OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

A.V. Borodulin, T.A. Bondarenko, V.V. Borunova, R.I. Ludanny

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

Key words: antibiotic resistance, aminoglycoside antibiotics, *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-196>

Введение. Аминогликозиды являются классом антибактериальных препаратов, наиболее эффективных для лечения туберкулёза, однако широкое распространение штаммов, устойчивых к данному классу препаратов за счёт накопления мутаций в рибосомальных генах микобактерий (в частности в гене 16S рРНК — *rrs*) диктует необходимость создания высокоточных диагностических систем для выявления таких генетических изменений с целью оптимизации выбора схем противотуберкулёзной терапии.

Цель исследования. Разработка диагностической системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для быстрой и точной детекции мутаций в гене *rrs*, ассоциированных с резистентностью *M. tuberculosis* к препаратам класса аминогликозидов (стрептомицин, канамицин, амикацин и т.д.).

Материалы и методы. В работе использовались методы локус-специфичной и РТ-ПЦР и секвенирования по Сэнгеру продуктов ПЦР нативной ДНК, экстрагированной из клинического материала и клинических изолятов *M. tuberculosis*, полученных от больных туберкулёзных больниц Московского региона. Фенотипическая чувствительность была определена для каждого изолята с помощью метода абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена. Для дизайна олигонуклеотидов и сравнительного анализа при поиске мутаций использовалась последовательность гена рДНК *rrs* [NC_000962.3].

Биоинформатическая поддержка осуществлялась при помощи программного обеспечения Geneious (ver. 7.2).

Результаты. Ранее при исследовании более 700 образцов было показано, что доля выявленных клинически значимых мутаций составляет 52,2%. Для каждого участка *rrs*, содержащего интересующие мутации, были синтезированы положительные контрольные образцы (ПКО), получены и протестированы панели праймеров и флуоресцентных ПЦР-зондов и отобраны мультиплексные системы, которые будут использоваться в дальнейшей работе.

Выводы. Создан прототип набора реагентов, оптимизирована работа праймеров и зондов собственного дизайна к двум участкам гена *rrs*, мутации в которых ассоциированы с устойчивостью *M. tuberculosis* к препаратам класса аминогликозидов. Результаты будут использованы в дальнейшем при отработке и валидации ПЦР-системы для диагностики мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к препаратам этого класса.



РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *rpsL*, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА К СТРЕПТОМИЦИНУ

В.В. Борунова, А.В. Бородулин, Т.А. Бондаренко, Р.И. Луданный

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, множественная лекарственная устойчивость, *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-198>

DEVELOPMENT OF A REAGENT ASSAY FOR DETECTION OF MUTATIONS IN *rpsL* GENE ASSOCIATED WITH STREPTOMYCIN RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

V.V. Borunova, A.V. Borodulin, T.A. Bondarenko, R.I. Ludanny

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

Key words: antibiotic resistance, multiple drug resistance, *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-198>

Введение. Основной проблемой низкой эффективности лечения туберкулёза является рост количества больных с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) микобактерий туберкулёза (МБТ).

С клинической точки зрения, одной из причин возникновения МЛУ МБТ является поздняя диагностика лекарственной устойчивости возбудителя. Выявление устойчивости МБТ традиционными микробиологическими методами, в частности методом абсолютных концентраций, может достигать 12 недель. В связи с этим существует острая необходимость в разработке новых подходов, позволяющих быстро и надёжно определять резистентность МТБ к антибиотикам. Одним из таких подходов является выявление мутаций, связанных с антибиотикорезистентностью, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Цель исследования. Основной целью данной работы является создание диагностического набора для детектирования мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулёзным препаратам второго ряда (стрептомицину, канамицину, амикацину и др.).

Материалы и методы. Основным методом, используемым в данной работе, является ПЦР с использованием зондов с флуоресцентными метками, содержащих в своём составе модифицированные нуклеотиды (LNA). Для дизайна олигонуклеотидов использовалась последовательность генов *rpsL* [NC_000962.3].

Биоинформатическая поддержка осуществлялась при помощи программного обеспечения Geneious (v. 7.2).

Результаты. Ранее было проведено популяционное исследование по выявлению мутаций, ассоциированных с устойчивостью к стрептомицину, в штаммах МБТ, циркулирующих в Московском регионе. На основании результатов данного исследования были отобраны наиболее часто встречающиеся мутации в гене *rpsL*, которые ассоциированы с устойчивостью МБТ к стрептомицину. Подобраны праймеры и зонды с флуоресцентными метками для детектирования мутаций в гене *rpsL* и оптимизированы условия их работы. Для проверки работы системы получены положительные контрольные образцы двух типов (дикого и мутантного).

Выводы. Создан прототип диагностического набора, подобраны и протестированы праймеры и зонды к участкам гена *rpsL*, мутации в которых ассоциированы с устойчивостью к стрептомицину. Результаты будут использованы для дальнейшей работы над созданием полноценного набора реагентов.



МОНИТОРИНГ АНТИ-SARS-CoV-2 АНТИТЕЛ У КОНТАКТНЫХ ЛИЦ ДО И ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ КРОВИ В ПРОБИРКАХ СМАРТЮБ

Р.А. Бурханов¹, Л.В. Черкасова¹, Р.О. Темирлиева¹, Ю.А. Астраханцев¹,
А.П. Лапко², А.И. Видрак², В.В. Сорвачев², Д.Е. Меламед³, Е.В. Кравченко³

¹Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» в CAO города Москвы, Москва;

²ООО «БИОЛАЙФ», Москва;

³ООО «СМАРТ-БИОТЕХ», Реховот, Израиль

Ключевые слова: мониторинг, COVID-19

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-200>

MONITORING OF ANTI-SARS-COV-2 ANTIBODIES IN CONTACT PEOPLE BEFORE AND AFTER INCUBATION OF BLOOD IN SMARTUBES

R.A. Burkhanov¹, L.V. Cherkasova¹, R.O. Temirliева¹, Yu.A. Astrakhantsev¹, A.P. Lapko²,
A.I. Vidrak², V.V. Sorvachev², D.E. Melamed³, E.V. Kravchenko³

¹Moscow Center for Hygiene and Epidemiology, the Branch in the Northern Administrative District of Moscow, Moscow, Russia;

²Biolife Moscow, Moscow, Russia;

³Smart Biotech, Rehovot, Israel

Key words: monitoring, COVID-19

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-200>

Введение. Установлено, что вирус SARS-CoV-2, вызывающий COVID-19, обладает иммуносупрессивным свойством в отношении лимфоцитов, ответственных за первичный иммунный ответ и продукцию иммуноглобулинов. Проявлением такого влияния могут быть ложноотрицательные ответы в первые дни заболевания и, как следствие, запоздалые выявление, изоляция и лечение больных. В этой связи представляется перспективным применение СМАРТЮБ, содержащих многокомпонентную, запатентованную фирмой «SMART Biotech Ltd» (Израиль) смесь иммуномодуляторов, способных, как было показано в отношении ВИЧ и гепатита С, усиливать выработку специфических антител (АТ) *in vitro*.

Цель исследования. Изучение информативной ценности применения пробирок СМАРТЮБ для мониторинга АТ к SARS-CoV-2 методом ИФА при профилактических исследованиях.

Материалы и методы. Всего было исследовано 47 образцов крови лиц, бывших в контакте с больными ОРВИ и COVID-19. Пробы отбирались в пробирки с гепарином с последующим внесением 1 мл крови в СМАРТЮБ, содержащих

реакционную смесь в объеме 2 мл. Пробирки помещали в термостат (37°C) с 5% CO₂ и инкубировали в течение 2 суток. По окончании срока инкубации определяли уровень антител (ИФА) наборами: ЗАО «Вектор-Бест» с отдельным определением уровня АТ IgM и IgG, ИБХ РАН IgM-IgA-IgG-тест с суммарным определением АТ и «Euroimmun» с определением АТ IgA класса. Результат выражался индексом позитивности, который высчитывался после измерения оптической плотности проб в АИФР «Униплан» (450/630 нм).

Результаты и обсуждение. У исследуемого контингента лиц получены положительные результаты определения АТ, что свидетельствует об инфицировании и формировании иммунной реакции. Из 47 проб до инкубации в 9 (19%) пробах обнаружены АТ IgG, в 7 (14,9%) — суммарные АТ и в 1 (2%) — АТ IgM. После инкубации число проб с положительным результатом увеличилось: до 9 (19%) проб при исследовании суммарных АТ и до 7 (14,9%) проб АТ IgM. АТ IgA обнаружены в 2 пробах до инкубации и в 3 — после. Число проб с положительным результатом обнаружения АТ IgG после инкубации не увеличилось.

Выводы. Смесь СМАРТЮБ преимущественно активизирует ранние АТ, что представляется важным для выявления скрытых форм заболевания с ложно-отрицательными ответами.



ДНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА МАРБУРГ, СОДЕРЖАЩАЯ ОСНОВНЫЕ АНТИГЕНЫ ПАТОГЕНА

Н.В. Волкова, А.А. Исаева, О.С. Таранов, Е.И. Казачинская, Д.Н. Щербаков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

Ключевые слова: вирус Марбург, вакцина, поверхностный гликопротеин, нуклеопротеин, матриксный белок VP40

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-202>

DNA VACCINE AGAINST MARBURG VIRUS CONTAINING BASIC PATHOGEN ANTIGENS

N.V. Volkova, A.A. Isaeva, O.S. Taranov, E.I. Kazachinskaya, D.N. Shcherbakov

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia

Key words: Marburg virus, vaccine, surface glycoprotein, nucleoprotein, VP40 matrix protein

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-202>

Введение. В 1967 г. мир узнал о существовании вируса Марбург (MARV), который вызывает у людей и приматов лихорадку Марбург. Данное заболевание характеризуется тяжёлым течением, высоким уровнем контагиозности и летальности. С тех пор учёные разрабатывают вакцину против вируса Марбург. Основная проблема в разработке вакцины против филовирусов состоит в том, что необходимо работать в лаборатории с высоким уровнем биобезопасности, поэтому альтернативным способом является работа с ДНК вируса.

Цель исследования. Конструирование вектора, в составе которого будут содержаться основные белки вируса Марбург.

Материалы и методы. Из базы данных Genbank были взяты нуклеотидные последовательности, кодирующие основные белки GP (CAA82539.1), NP (CAA82536.1) и VP40 (CAA82538.1) MARV. Были проведены оптимизация кодонного состава и искусственный синтез в составе донорной плазмиды GH. Для сборки целевой конструкции были рассчитаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры.

Результаты. Гены, кодирующие белки VP40, NP и GP вируса Марбург, амплифицированы и клонированы в состав вектора pVAKS в несколько этапов. Синтез РНК, включающий все три гена, находится под контролем цитомегаловирусного промотора. Для того чтобы обеспечить одновременный синтез трёх целевых белков с единой матрицы, в состав конструкции были введены следующие регуляторные элементы: последовательность саморасщепляемого пептида P2A между геном матриксного белка VP40 и геном нуклеопротеина NP

вируса и IRES (внутренний сайт посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита) между геном нуклеопротеина и геном поверхностного гликопротеина GP вируса Марбург. Наличие встройки подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по методу Сэнгера.

Для подтверждения синтеза трёх целевых белков полученной плазмидой была проведена трансфекция культуры клеток HEK293T. Микроскопические исследования показали формирование филоментоподобных структур. Оценку антигенных свойств полученных вирусоподобных частиц проводили при помощи вестерн-блота.

Выводы. Полученная рекомбинантная плазмида обеспечивает синтез трёх белков вируса Марбург: GP, NP и VP40.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ № 18-04-00458.



АПРОБАЦИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВГЧ-6А И ВГЧ-6В НА ПАНЕЛИ КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

А.А. Вязовая¹, Э.А. Домонова², А.В. Лисок³, О.Ю. Сильвейстрова², М.А. Никольский⁴,
В.Е. Ведерников³, О.В. Нарвская¹

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

²ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

³ГК «АлкорБио», Санкт-Петербург;

⁴ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Ключевые слова: вирус герпеса человека 6А, вирус герпеса человека 6В, полимеразная цепная реакция, ПЦР, панель контрольных образцов

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-204>

TESTING OF RUSSIAN DIAGNOSTIC KIT OF REAGENTS FOR DIFFERENTIATION OF HHV-6A AND HHV-6B ON THE CONTROL SAMPLES PANEL

А.А. Vyazovaya¹, Е.А. Domonova², А.В. Lisok³, О.У. Silveystrova², М.А. Nikolskiy⁴,
V.E. Vedernikov³, O.V. Narvskaya¹

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia;

²Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

³Alkor Bio Group of Companies, Saint Petersburg, Russia;

⁴Pavlov First State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Key words: human herpesvirus 6A, human herpesvirus 6B, polymerase chain reaction, PCR, panel of control samples

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-204>

Введение. Согласно международной классификации, с 2012 года вирус герпеса человека 6А (ВГЧ-6А) и вирус герпеса человека 6В (ВГЧ-6В) являются самостоятельными таксономическими единицами [1]. Оба уникальных вида относятся к подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus*, однако, несмотря на большую схожесть между собой, они различаются по клеточному тропизму *in vitro*, нуклеотидной последовательности и являются этиологическими агентами различных заболеваний [2].

В настоящее время в России дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в диагностических целях не проводится. В связи с этим разработан первый уникальный набор реагентов для выявления ДНК ВГЧ-6А и ВГЧ-6В «Интифика HHV6 А/ HHV6 В» (ГК «АлкорБио»). Видовая идентификация основана на обнаружении специфических однонуклеотидных полиморфизмов в гене U67

методом ПЦР-РВ (пат. RUS 2627607). Набор реагентов проходит клинические испытания.

Цель исследования. Протестировать разработанный набор реагентов с использованием панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В.

Материалы и методы. В рамках апробации тестировали панель контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Контрольная панель включала в себя 12 зашифрованных образцов: 10 положительных и 2 отрицательных. Положительные образцы представляли собой препараты очищенной ДНК клинических изолятов ВГЧ-6А или ВГЧ-6В, выделенных от пациентов с лабораторно подтвержденной наследуемой хромосомной интеграцией ВГЧ-6А, -6В или больных внезапной экзантемой. Отрицательные — препараты очищенной ДНК, экстрагированной из биологического материала, не содержащего ВГЧ-6А/В. При формировании контрольной панели экстракцию ДНК из образцов биологического материала (плазма крови, моча) проводили при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147). Количественное определение ДНК ВГЧ-6А/В выполняли методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® HNV6-скрин-титр-FL» (РУ № ФСР 2010/09506). Постановку и анализ результатов амплификации проводили на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «Rotor-Gene Q» (Qiagen, ФРГ). Видовую принадлежность устанавливали на основании анализа данных, полученных методом массового параллельного секвенирования («MiSeq», Illumina, США). Расшифровку панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В осуществляли в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Видовую идентификацию ДНК ВГЧ-6А/В в анализируемых образцах проводили методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «Интифика HNV6 А/HNV6 В» (ГК «АлкорБио») на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «CFX96 Touch» (Bio-Rad, США). По каналу HEX осуществлялась специфическая детекция флуоресцентного сигнала для ДНК ВГЧ-6А, ROX — ВГЧ-6В и FAM — фрагмента гена β -2-микроглобулина человека.

Результаты. Среди зашифрованных образцов контрольной панели были определены в двух случаях ДНК ВГЧ-6В, в восьми — ДНК ВГЧ-6А, в двух ДНК вирусов не обнаружена. Как видно из таблицы, расхождений в полученных данных с разработчиком контрольной панели не выявлено.

Выводы. Разработанный набор реагентов «Интифика HNV6 А/ HNV6 В» (ГК «АлкорБио») позволил провести идентификацию ДНК ВГЧ-6А, ВГЧ-6В и показал 100-процентное совпадение результатов при тестировании панели контрольных образцов ВГЧ-6А/В (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Набор

Сопоставление результатов тестирования образцов контрольной панели

№ образца	Тип исходного биологического материала	Заданные параметры (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)		Полученные результаты (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера)
		вид микроорганизма	концентрация (копий ДНК/мл)	вид микроорганизма
1	Моча	ВГЧ-6А	$2,0 \times 10^3$	ВГЧ-6А
2	Плазма крови	Отсутствует	–	Отсутствует
3	Плазма крови	ВГЧ-6А	$3,3 \times 10^4$	ВГЧ-6А
4	Плазма крови	ВГЧ-6А	$8,5 \times 10^4$	ВГЧ-6А
5	Плазма крови	ВГЧ-6А	$2,2 \times 10^5$	ВГЧ-6А
6	Моча	ВГЧ-6В	$6,9 \times 10^4$	ВГЧ-6В
7	Моча	ВГЧ-6В	$1,6 \times 10^4$	ВГЧ-6В
8	Плазма крови	ВГЧ-6А	$7,5 \times 10^3$	ВГЧ-6А
9	Плазма крови	ВГЧ-6А	$1,7 \times 10^4$	ВГЧ-6А
10	Плазма крови	Отсутствует	–	Отсутствует
11	Плазма крови	ВГЧ-6А	$3,6 \times 10^4$	ВГЧ-6А
12	Плазма крови	ВГЧ-6А	$1,6 \times 10^5$	ВГЧ-6А

реагентов может быть использован как для диагностики, так и в эпидемиологических исследованиях заболеваний человека, ассоциированных с ВГЧ-6А/В.

Литература

1. Adams M.J., Carstens E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on taxonomy of viruses (2012). *Arch. Virol.* 2012; 157(7): 1411–22. DOI: 10.1007/s00705-012-1299-6.
2. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* 2014; 159(5): 863–70. DOI: 10.1007/s00705-013-1902-5.



ПОДЛИННОСТЬ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1b: РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ

Е.О. Голощапова, А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

Ключевые слова: *интерферон бета-1b, подлинность, пептидное картирование*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-207>

STRUCTURE IDENTITY OF RECOMBINANT INTERFERON BETA-1b MOLECULE: VERIFICATION METHOD DEVELOPMENT

E.O. Goloshchapova, A.S. Minero, O.B. Runova, O.B. Ustinnikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Key words: *interferon beta-1b, identity, peptide mapping*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-207>

Введение. Рекombинантный интерферон (ИФН) бета-1b применяется, наряду с интерфероном бета-1a, в качестве препарата первой линии при лечении рассеянного склероза. Структурные отличия интерферона бета-1b заключаются в отсутствии гликозилирования, а также в замене цистеина на серин в позиции 16.

Оценка качества данных препаратов должна соответствовать общим требованиям, предъявляемым к белкам, полученным с применением технологии рекомбинантной ДНК, а также требованиям непосредственно к интерферонам. Однако как международные, так и отечественные фармакопейные требования к интерферону бета-1b, в отличие от бета-1a, отсутствуют. Требования и методики оценки качества интерферона бета-1a, изложенные в монографии 01/2009:1639 Европейской Фармакопеи, не применимы для интерферона бета-1b в силу существенных структурных различий данных белков. Анализ нормативной документации производителей фармацевтической субстанции интерферона бета-1b подтвердил достаточность и обоснованность спецификаций за исключением показателя «Подлинность. Структура». Данный показатель является обязательным для рекомбинантных белков, определяется, как правило, методом пептидного картирования и, наряду с показателем «Подлинность. Специфическая активность», является подтверждением эффективности и безопасности данных лекарственных препаратов.

Цель исследования. Разработка методики подтверждения подлинности структуры молекулы рекомбинантного ИФН бета-1b.

Материалы и методы. В работе использованы 3 субстанции интерферона бета-1b; эндопротеиназа Glu-C; метод ВЭЖХ (условия разделения ЕФ 07/2015:1110); метод тандемной масс-спектрометрии.

Результаты. В ходе исследования была разработана методика пептидного картирования с хроматографическим разделением продуктов ферментативного гидролиза. Масс-спектрометрический анализ пептидов, соответствующих основным пикам, выявил высокую специфичность по отношению к исходной молекуле и обеспечил около 50% покрытия.

Выводы. Разработанная методика может быть использована при подтверждении подлинности структуры интерферона бета-1b на уровне субстанции, не содержащей стабилизаторов белковой природы.



РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ NS1 БЕЛКА ВИРУСА ДЕНГЕ

И.С. Кассиров, А.С. Долгова

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург

Ключевые слова: *Flavivirus, NS1, рекомбинантные белки, трансгенная экспрессия*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-209>

DEVELOPMENT OF EXPRESSION CASSETTE FOR EFFICIENT PRODUCTION OF NS1 PROTEIN OF THE DENGUE VIRUS

I.S. Kassirov, A.S. Dolgova

Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Key words: *Flavivirus, NS1, recombinant proteins, transgene expression*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-209>

Введение. Как известно, специфических препаратов для лечения геморрагических лихорадок, вызываемых вирусами рода *Flavivirus*, пока не разработано. Единственная мера сдерживания — это своевременная диагностика. Одним из наиболее перспективных белков вирусов рода *Flavivirus* для использования в составе кандидатных вакцин или диагностических систем является NS1 (обладает низкой кросс-реактивностью). Однако при получении этого белка в рекомбинантной форме необходима система посттрансляционной модификации, которая отсутствует у прокариот. Ранее нами была показана возможность получать данные белки в растительных системах, однако экспрессионные конструкции требовали доработки для использования белка в промышленных масштабах.

Цель исследования. Разработка эффективных экспрессионных кассет для получения NS1 вируса Денге в растительных организмах для дальнейшего использования этого белка в диагностических системах на основе ИФА.

Материалы и методы. Для разработки наиболее эффективного механизма экспрессии в целевой конструкции был использован целый ряд регуляторных элементов. Для избегания негативной регуляции со стороны растительного иммунитета были использованы последовательности MAR гена *Rb7* (U67919.1). Для увеличения уровня экспрессии использовались интрон UBQ10 (AT1G67090), действующий посредством интрон-опосредованного усиления, и 5'- и 3'-некодирующие области *RuBisCO* (AT1G67090), несущие тканеспецифичные и энхансерные мотивы. Также для подбора оптимальных условий

экспрессии было проверено несколько конститутивных и тканеспецифичных промоторов. Конечные варианты конструкций анализировались посредством биоинформатических инструментов.

Результаты и выводы. Результатом нашей работы является дизайн экспрессионной кассеты, способной обеспечивать высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка NS1 вируса Денге или любого другого флавивируса. Оценка эффективности разработанной конструкции была подтверждена рядом биоинформатических инструментов (WoLF PSORT/NetGene2/NetOGlyc/ (<http://www.kazusa.or.jp/>)).

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации № МК-569.2020.4.



ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *M. LEPRAE* В КАЧЕСТВЕ СЕРОДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ

А.Г. Королёва-Ушакова, Е.А. Панфёров, Е. В. Баранова, А.А. Горбатов, С.Ф. Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора», Оболensk

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, ЛАМ, ФГЛ-1, рекомбинантные антигены, лепра, серодиагностика, иммуноферментный анализ

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-211>

RESEARCH OF RECOMBINANT *M. LEPRAE* PROTEINS AS SERODIAGNOSTIC ANTIGENS

A.G. Korolyova-Ushakova, E.A. Panfertsev, E.V. Baranova, A.A. Gorbato, S.F. Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Key words: molecular genetic methods, LAM, FGL-1, recombinant antigens, leprosy, serodiagnostics, enzyme immunoassay

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-211>

Введение. ВОЗ рекомендует диагностику лепры, основанную на совокупности клинических проявлений, результатов бактериоскопических и гистопатологических исследований. Однако в последние десятилетия интенсивно исследуется возможность диагностики с помощью определения специфических антител. Для этого были использованы антигены различной природы, главным образом углеводные, такие как ФГЛ-1 (фенольный гликолипид) и ЛАМ (липоарабиноманнан). Показано, что некоторые белки *M. leprae* могут служить мишенями для определения специфического клеточного и гуморального иммунитета при лепре.

Цель исследования. В данной работе мы поставили цель исследовать рекомбинантные белки *M. leprae* ML0050 и ML0576 на способность взаимодействовать с сыворотками больных лепрой.

Материалы и методы. В работе использовали молекулярно-генетические, биохимические методы, иммунохимические методы. Полученные рекомбинантные антигены *M. leprae* ML0050 и ML0576 тестировали иммуноферментным методом с панелью сывороток: здоровых доноров, больных лепрой и больных туберкулёзом.

Результаты. Из биомассы штаммов — продуцентов *E. coli* выделены и очищены при помощи аффинной хроматографии рекомбинантные белки *M. leprae* ML0050 и ML0576. Установлено, что данные белки взаимодействуют с сыворотками больных лепрой и обладают некоторой перекрёстной реактивностью с сыворотками больных туберкулёзом.

Выводы. Полученные результаты указывают на перспективу использования рекомбинантных белков ML0050 и ML0576 в серодиагностике лепры.



КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОГО И АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ПОДТИПОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

В.И. Корчагин, О.П. Дрибноходова, К.О. Миронов

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

На независимой выборке из 767 пациентов проведены клинические испытания набора реагентов для анализа генетического риска развития ишемического инсульта. Для каждой из 6 групп маркеров в соответствии с разработанной моделью определены показатели генетического риска развития ишемического инсульта в группах больных и здоровых и проведён анализ его распределения между группами. Различия между выборками пациентов и контрольной группой по значениям генетического риска определены как статистически значимые ($p < 0,01$) для двух групп локусов, ассоциированных с повышенным риском развития атеротромботического и кардиоэмболического подтипов ишемического инсульта в группах пациентов с соответствующим подтипом. По результатам экспертизы на набор реагентов для определения генетического риска развития ишемического инсульта «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL» выдано регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8874 от 05.09.2019.

Ключевые слова: ишемический инсульт, генетический риск, SNP

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-212>

CLINICAL TRIALS OF THE DIAGNOSTIC SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF GENETIC RISKS OF CARDIOEMBOLIC AND ATHEROTROMBOTIC SUBTYPES OF ISCHEMIC STROKE

V.I. Korchagin, O.P. Dribnokhodova, K.O. Mironov

Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia

A clinical trial of the diagnostic kit for analysis of the genetic predisposition to ischemic stroke was carried out on an 767 independent blood samples. Genetic risk's values of ischemic stroke were determined in the groups of patients and control, and its distribution between 6 groups of SNP combinations was analyzed in accordance with the suggested model. The differences by genetic risk values between the patient's samples and the control group were determined as statistically significant ($p < 0.01$) for two groups of loci associated with an increased risk of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke subtypes in the corresponding patient's subgroups. Registration certificate No. RZN 2019/8874 dated 05.09.2019 was issued according to the results of the clinical trial of the diagnostic kit for determining the genetic risk of ischemic stroke «AmpliSens® Genoscreen Stroke SNP-FL».

Key words: ischemic stroke, genetic predisposition, SNP

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-212>

Введение. Ранее нами на основании 48 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), ассоциированных с риском развития ишемического инсульта (ИИ), были разработаны набор реагентов и методика расчёта индивидуального генетического риска. Набор реагентов может быть использован при скрининговом обследовании для выявления лиц, имеющих генетическую предрасположенность к развитию ИИ, а также для изучения генетических особенностей других мультифакторных заболеваний, ассоциированных с определяемыми полиморфизмами. С целью регистрации данного набора реагентов и для определения групп маркеров с лучшими прогностическими показателями в отношении ИИ проведены клинические испытания на независимых выборках пациентов.

Цель исследования. Определение предиктивных характеристик системы расчёта генетического риска ишемического инсульта на основе анализа SNP.

Материалы и методы. Проанализировано 727 образцов ДНК от 367 человек опытной группы с ИИ в анамнезе, из них 124 пациента с кардиоэмболическим (КЭ) подтипом ИИ, 243 — с атеротромботическим (АТ) подтипом ИИ и 360 человек контрольной группы без ИИ. Средний возраст составил 62 и 58 лет соответственно. Обе группы максимально подобны по этнической принадлежности и социальному статусу. Во всех образцах ДНК определён генотип по 48 SNP [1], которые были классифицированы на шесть групп [2]. Расчёт риска произведён по мультипликативной модели в соответствии с опубликованной ранее методикой для расчёта вклада генетических факторов в риск возникновения мультифакторного заболевания [3] с незначительными модификациями [2, 4]. Для каждого используемого в нашей методологии SNP предполагается известными отношение шансов (ОШ) гетерозиготы (OR_2) и гомозиготы (OR_3) по мутантному аллелю относительно гомозиготы по «дикому» аллелю и частоты встречаемости генотипов в популяции: F_1 , F_2 , и F_3 , то есть частоты гомозигот по «дикому» аллелю, гетерозигот и гомозигот по мутантному аллелю соответственно. Величины ОШ (OR_2 и OR_3) взяты непосредственно из результатов исследований генетической предрасположенности к ИИ, опубликованных в рецензируемых международных научных изданиях [1, 2]; величины F_1 , F_2 , и F_3 для популяции европеоидов (Caucasian) — из базы данных Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information). Принципиальная возможность использования популяционных частот, выбранных SNP в расчётах для российской выборки, ранее показана в сравнительных исследованиях [5].

Средний популяционный риск (average population risk, APR) по отдельному SNP вычисляется по формуле: $APR = F_1 \times 1 + F_2 \times OR_2 + F_3 \times OR_3$.

По определению средний популяционный риск больше 1, если мутантный аллель является аллелем риска, и меньше 1, если мутантный аллель протективен (снижает РР инсульта).

Относительный риск каждого из трех генотипов по отдельному SNP вычисляется по формулам: $RR_1 = 1/APR$, $RR_2 = OR_2/APR$ и $RR_3 = OR_3/APR$.

В предлагаемой методологии обобщённый относительный риск (GRR), обусловленный комбинацией аллелей, объединённых в группу, определяется в соответствии с мультипликативной моделью по формуле:

$$GRR_{\text{комбинации}} = RR^1 \times RR^2 \times RR^3 \dots \times RR^i,$$

где $RR^1 \dots RR^i$ — относительные риски по каждому из SNP, включённых в группу.

При этом распределение значений обобщённого относительного риска в популяции определяется частотами встречаемости соответствующих генотипов в данной популяции. Соответственно, группы пациентов разделялись на подгруппы с наличием или отсутствием генетической предрасположенности исходя из того, выше или ниже значение индивидуального GRR по отношению к среднему популяционному риску по каждой группе маркеров.

Результаты. При проведении клинических испытаний набора реагентов для групп маркеров «Инсульт-2», «Липидный обмен», «Гемостаз» и «Клеточные взаимодействия» полученные значения ОШ у пациентов с ИИ по отношению к контрольной группе не превышали 1, и, соответственно, различия по генетической предрасположенности между пациентами и контрольной группой были статистически незначимы. В то же время выявлены две группы маркеров, имеющих предсказательную ценность в отношении генетической составляющей предрасположенности к ИИ, значения ОШ и разбиение выборок по группам представлены в таблице. Для группы маркеров «Инсульт-1» характерна специфичность к КЭ подтипу ИИ, что связано с функциями генов, входящих в эту группу. Расчёты показывают, что значение ОШ достигает 1,85 (95% ДИ 1,20–2,87; $p = 0,004$), что свидетельствует об эффективности выявления генетической предрасположенности к развитию КЭ подтипа ИИ. Поскольку при проведении клинических испытаний в выборку пациентов входили как больные с КЭ, так и больные с АТ подтипом ИИ, то на общей выборке пациентов статистическая значимость результатов оказалась ниже, чем на выборке только больных с КЭ подтипом ОШ = 1,27 (95% ДИ 0,94–1,72; $p = 0,12$).

Также для группы маркеров «Артериальная гипертензия» выявлена специфичность по отношению к АТ подтипу ИИ — генетический риск в выборке пациентов с АТ подтипом выше, чем в контрольной группе: ОШ = 1,58 (95% ДИ 1,11–2,26), $p = 0,009$ (таблица).

Выводы. Получены подтверждения клинической эффективности набора реагентов, включающего группы «Инсульт-1» (8 SNP) и «Артериальная гипер-

Сравнительная характеристика генетической предрасположенности к развитию КЭ и АТ подтипов ИИ, определённой по группам маркеров «Инсульт-1» и «Артериальная гипертензия» в группах пациентов с ИИ и в контрольной группе

Группа пациентов	Генетическая предрасположенность*		Всего	ОШ (95% ДИ)	p
	есть	нет			
Группа маркеров «Инсульт-1»					
Пациенты с КЭ ИИ	75	49	124	1,85 (1,20–2,87)	0,004
Контрольная группа	163	197	360		
Группа маркеров «Артериальная гипертензия»					
Пациенты с АТ ИИ	99	144	243	1,58 (1,11–2,26)	0,009
Контрольная группа	109	251	360		

* — Генетическая предрасположенность оценивалась исходя из отнесения пациента к группе с риском выше или ниже среднего популяционного риска.

тензия» (11 SNP). После проведения экспертизы набора реагентов для определения генетического риска развития ИИ «АмплиСенс® Геноскрин Stroke SNP-FL» выдано регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8874 от 05.09.2019.

Литература

1. Корчагин В.И., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Максимова М.Ю., Иллариюшкин С.Н., Танащян М.М. и др. Роль генетических факторов в формировании индивидуальной предрасположенности к ишемическому инсульту. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2016; (1): 65–75.
2. Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Дунаева Е.А., Корчагин В.И., Платонов А.Е., Шипулин Г.А. Способ определения индивидуального генетического риска развития ишемического инсульта. Патент РФ на изобретение № 2612630/09.03.2017. Бюл. № 7.
3. Padhukasahasram B., Halperin E., Wessel J., Thomas D.J., Silver E., Trumbower H. et al. [Presymptomatic risk assessment for chronic non-communicable diseases]. *PLOS One*. 2010; 31; 5(12):e14338. DOI: 10.1371/journal.pone.0014338.
4. Корчагин В.И., Миронов К.О., Платонов А.Е., Дрибноходова О.П., Аксельрод Э.В., Дунаева Е.А. и др. Комплексная оценка вклада генетических факторов в развитие ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуск. 2017; 117(12): 11–18.
5. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Корчагин В.И., Дунаева Е.А., Аксельрод Э.В., Титков А.В. и др. Характеристика 48 полиморфных локусов — потенциальных маркеров риска развития ишемического инсульта. *Генетика*. 2017; 53(6): 716–722.



ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА НА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ПАНЕЛИ ОБРАЗЦОВ ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА

И.С. Литау¹, М.В. Альварес Фигероа¹, А.А. Казюлина¹, Л.В. Домотенко²

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора», Оболensk

Разработанная стратегия ВОЗ по ликвидации туберкулёза предусматривает в том числе осуществление ранней диагностики этого заболевания путём имплементации быстрых диагностических тестов, использующих методы молекулярной диагностики. Для их корректного использования необходимо повысить качество лабораторных услуг, включающих внешнюю оценку качества. В ходе исследования по оценке аналитических характеристик наборов реагентов для диагностики туберкулёза на отечественной контрольной панели образцов внешней оценки качества за 5-летний период показаны 100-процентные чувствительность и специфичность. При определении воспроизводимости обоих наборов реагентов CV не превысил 15%.

Ключевые слова: ВОК, МТВс, туберкулёз, ПЦР-РВ

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-216>

EVALUATION OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF TB DIAGNOSTIC REAGENT KITS ON DOMESTIC CONTROL PANEL OF EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SAMPLES

I.S. Litau¹, M.V. Alvarez Figueroa¹, A.A. Kazyulina¹, L.V. Domotenko²

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

The WHO tuberculosis eradication strategy includes early diagnosis of the disease through rapid diagnostic tests using molecular diagnostic techniques. For their correct use, it is necessary to improve the quality of laboratory services, including external quality assessment (EQA). In the course of the study on evaluation of analytical characteristics of TB diagnostic kits, 100% sensitivity and specificity are shown on the domestic control panel of EQA samples over a 5-year period. When determining the reproducibility of both sets of reagents, the CV did not exceed 15%.

Key words: EQA, MTBc, tuberculosis, PCR-RT

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-216>

Введение. Всемирная организация здравоохранения при разработке стратегии по ликвидации туберкулёза (ТБ) издала программный документ «Основные индикаторы и цели по усилению лабораторных служб в рамках стратегии

по ликвидации туберкулёза», в котором отражена необходимость осуществления ранней диагностики туберкулёза (ТБ) [1]. Быстрые диагностические тесты, одобренные ВОЗ, должны быть ключевыми в диагностическом обследовании всех лиц с предполагаемым ТБ [2]. Для того чтобы любая национальная программа по борьбе с ТБ могла достичь этой цели, должно быть выполнено предварительное условие, которое состоит в наличии сети лабораторий, отвечающих стандартам качества и оборудованных средствами быстрой диагностики [2]. Для укрепления лабораторного потенциала необходимо: 1) расширение доступа к быстрому и точному выявлению ТБ; 2) повышение качества лабораторных услуг. В рамках последнего условия присутствует такой показатель, как «Процентная доля диагностических лабораторий, осуществляющих мониторинг показателей эффективности и охваченных той или иной системой внешней оценки качества (ВОК) в отношении всех применяемых методов диагностики» [1], что говорит о важности таких мероприятий в Национальных программах борьбы с ТБ.

ВОК исследований, выполняемых в клинико-диагностических и бактериологических лабораториях, является одной из важнейших составляющих обеспечения их правильности и, соответственно, эффективности. Участие лабораторий в ВОК обеспечивает соответствие существующим международным стандартам лабораторной диагностики и является неременным условием получения лабораторией лицензии на осуществление клинической лабораторной диагностики. Соответствующая нормативным документам организация инфраструктуры лабораторных помещений, надлежащим образом обученный и квалифицированный персонал, а также участие в системах внутреннего и внешнего контроля качества необходимы для получения и сохранения аккредитации и эффективного оказания медицинской помощи [3]. Постоянное участие в ВОК определено национальными стандартами и нормативными документами и отражено в основополагающем международном стандарте ISO 15189:2012, а также в аналогичном отечественном стандарте ГОСТ Р ИСО 15189-2015, приказах Минздрава России и других ГОСТах (ГОСТ Р 53022.1-2008, ГОСТ Р 53079.2-2008 и др.). В РФ такой системой является Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК).

Панель контрольных образцов «МГ выявление МБТ» изготавливается ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» по заказу Центра внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований. Каждая панель состоит из 12 образцов, представляющих собой пулы микобактерий разных штаммов группы *M. tuberculosis complex* (МТВс) или нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) с различным профилем фенотипической чувствительности. Количество пробирок каждого

пула меняется из цикла в цикл для обеспечения объективности при проведении исследований. Ежегодно лаборатории, выполняющие исследования возбудителя туберкулёза, проводят 2 раунда Межлабораторных сличительных испытаний. Хорошей практикой во всём мире является участие разработчиков наборов реагентов в системе ВОК с целью проверки качества ими разработанных и уже промышленно выпускаемых наборов реагентов, а также проходящих внедрение в производство и подготовку к регистрации.

Цель исследования. Анализ качества и эффективности наборов реагентов для ПЦР-диагностики ТБ производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Материалы и методы. Нами были протестированы зарегистрированные в установленном в РФ порядке в качестве медицинских изделий для *in vitro* диагностики наборы реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» и «АмплиСенс® МТС-diff-FL», предназначенные для обнаружения ДНК *MTB*с и видовой/штаммовой дифференциации *MTB*с. Тестирование проводилось вслепую с помощью метода ПЦР-PB на 120 образцах, входящих в состав 10 зашифрованных панелей циклов с 2-2015 по 1-2020 в режиме, соответствующем рутинной работе лаборатории. После получения результатов исследований, полученных «слепым» способом, раскрывалась информация о соответствии номеров образцов пулам и проводился анализ по пулам.

Результаты. Набор реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» предназначен для качественного выявления *MTB*с методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО) и последующей одновременной амплификацией участков ДНК *MTB*с и ВКО. Результаты исследования образцов пулов из контрольных панелей ВОК представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, все образцы *MTB*с дали положительный результат по обоим каналам, что свидетельствует о корректной работе набора и валидности полученных данных. Значения *Ct*, полученные в ходе исследования, имеющие обратную пропорциональную зависимость от концентрации измеряемого аналита в пробе, соответствуют концентрациям ДНК *MTB*с пулов. Значение коэффициента вариации (CV) не превышает 9,5% для канала Fam и 7,8% для канала JOE, что говорит о высокой воспроизводимости работы набора реагентов.

Набор реагентов «АмплиСенс® МТС-diff-FL» предназначен для дифференциации видов *MTB*с — человеческого (*M. tuberculosis*) и бычьего (*M. bovis*), а также вакцинного штамма (*M. bovis* BCG) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Для анализа реко-

Таблица 1. Результаты исследования панелей ФСВОК с помощью набора реагентов «АмплиСенс® МТС-FL»

№	Микобактерии, концентрация в КОЕ/мл	Количество образцов	Fam (IS 6110)			Joe (ВКО)		
			Ct	95% ДИ	CV, %	Ct	95% ДИ	CV, %
Пул 1	НТМБ, 10 ⁶	16	0,00	–	–	23,21	22,32–24,10	7,84
Пул 2	МТВс, 10 ³	14	16,41	16,08–16,74	3,83	22,27	21,86–22,67	3,49
Пул 3	МТВс, 10 ⁶	10	8,45	7,96–8,95	9,49	22,75	22,34–23,16	2,93
Пул 4	МТВс, 10 ⁵	18	11,20	10,76–11,64	8,55	22,48	22,17–22,79	2,99
Пул 5	МТВс, 10 ⁴	10	15,16	14,80–15,51	3,81	22,18	21,89–22,48	2,13
Пул 6	МТВс, 10 ⁵	16	11,97	11,47–12,47	8,55	22,38	22,00–22,75	3,42
Пул 7	МТВс, 10 ³	16	15,64	15,11–16,18	7,06	22,42	22,08–22,76	3,12
Пул 8	МТВс, 10 ³	20	15,09	14,65–15,53	6,66	22,58	22,32–22,83	2,59

Таблица 2. Результаты исследования панелей ФСВОК с помощью набора реагентов «АмплиСенс® МТС-diff-FL»

№	Микобактерии, концентрация в КОЕ/мл	Количество образцов	Fam (<i>M. tuberculosis</i>)			Cy5.5 (ВКО)		
			Ct	95% ДИ	CV, %	Ct	95% ДИ	CV, %
Пул 1	НТМБ, 10 ⁶	16	0,00	–	–	25,71	23,65–27,77	10,73
Пул 2	МТВс, 10 ³	14	20,94	19,80–22,07	10,32	25,58	23,69–27,46	14,04
Пул 3	МТВс, 10 ⁶	10	12,68	11,52–13,84	14,71	24,73	23,18–26,27	10,09
Пул 4	МТВс, 10 ⁵	18	15,01	14,09–15,91	13,15	25,08	23,63–26,53	12,51
Пул 5	МТВс, 10 ⁴	10	17,57	16,33–18,80	11,37	24,99	22,86–27,13	13,78
Пул 6	МТВс, 10 ⁵	16	16,54	15,54–17,54	12,30	25,08	23,78–26,38	10,56
Пул 7	МТВс, 10 ³	16	19,72	18,85–20,59	8,98	25,00	23,91–26,09	8,87
Пул 8	МТВс, 10 ³	20	18,85	17,96–19,73	10,74	24,75	23,70–25,80	9,64

мендовано использовать образцы ДНК, в которых на этапе обнаружения МТВс были получены положительные результаты.

В результате тестирования набор реагентов АмплиСенс® МТС-diff-FL (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) все образцы пулов 2–8 дали положительный результат по каналу Green/FAM и отрицательный результат по каналам Yellow/JOE и Orange/ROX (табл. 2), что свидетельствует о принадлежности штаммов к *M. tuberculosis*. Валидность исследования под-

тверждена получением сигналов по каналу детекции ВКО. Полученные данные полностью соответствуют характеристике образцов, заданной производителем. Значения *Ct* также соответствуют концентрациям ДНК *M. tuberculosis* пулов. Значение коэффициента вариации (CV) не превышает 14,71% для канала Fam и 14,04% для канала Cy5.5, что соответствует заявленной воспроизводимости набора реагентов. Оба набора реагентов показывают стабильный отрицательный результат при исследовании образцов НТМБ.

При сравнении с культуральным методом исследования образцов панелей получены следующие результаты: чувствительность 100% (95% ДИ 96,48–100) и специфичность 100% (95% ДИ 79,41–100).

Выводы. Проверка качества работы наборов реагентов для диагностики туберкулёза производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора с использованием панелей ФСВОК в течение 5-летнего периода показала их высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость.

Литература

1. ВОЗ. Основные индикаторы и цели по усилению лабораторных служб в рамках стратегии по ликвидации туберкулёза. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254587/9789244511473-rus.pdf?sequence=1> (дата обращения 11 сентября 2020).
2. Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулёза лёгких и туберкулёза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов / М. Dara, S. Ehsani, F. Drobniewski и др. // Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро, 2017. 29 с. [Электронный ресурс]. – URL: – http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/336118/ELI-TB-Laboratory_diag_algorithm_RUS.pdf?ua=1 (дата обращения 11 сентября 2020).
3. Drobniewski F.A., Hoffner S., Rusch-Gerdes S. et al. Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur. Respir. J.* 2006; 5(28): 903–909.



МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЦР

К.А. Осянин, К.В. Усольцев, Д.А. Миргазов, Л.И. Зайнуллин

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань

Ключевые слова: ДНК, ПЦР, лейкоз, лейкоциты

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-221>

THE MODIFICATION OF DNA ISOLATION METHOD TO INCREASE PCR SENSITIVITY IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

K.A. Osyenin, K.V. Usoltsev, D.A. Mirgazov, L.I. Zaynullin

Federal Center for Toxicology, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

Key words: DNA, PCR, leukemia, leukocytes

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-221>

Введение. Эффективности ПЦР бывает недостаточно при определении малых количеств возбудителя в начальной стадии заболевания, например, провируса лейкоза крупного рогатого скота, при этом также высока вероятность потери материала в процессе выделения ДНК из цельной крови.

Цель исследования. Снизить вероятность потери ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) для повышения качества анализа образцов исследуемой крови.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 70 образцов крови из неблагополучного хозяйства. Для выделения ДНК использовали набор ДНК-Сорб-В. В одном случае выделение ДНК производили согласно инструкции, в другом — с предварительной обработкой буфером А, обеспечивающим концентрирование лейкоцитов следующего состава: 320 мМ сахарозы 5,42 г, 1% тритон X-100 — 0,5 мл, 5 мМ $MgCl_2$ — 51 мг, 10 мМ Трис-НCl, ddH₂O — до 50 мл. В пробирки, содержащие 1 мл буфера А, вносили 400 мкл цельной крови, перемешивали переворачиванием, выдерживали при $-16^{\circ}C$ 10 мин. и затем центрифугировали 5 мин. при 6000 об/мин на центрифуге Eppendorf MiniSpin. К полученному осадку доливали 1 мл физиологического раствора, перемешивали и повторно центрифугировали 1 минуту при 6000 об/мин. Супернатант удаляли, а полученный осадок использовали в дальнейшем процессе выделения ДНК согласно инструкции к набору. При постановке ПЦР использовали набор

«Лейкоз КРС 100» ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», реакцию проводили на амплификаторе BioRadC1000 с анализом результатов в программе CFXManagerv 2.0.

Результаты. С применением набора ДНК-Сорб-В из 70 проб крови ДНК провируса лейкоза была обнаружена в 13 пробах, что составляет 18,6% зараженных животных. При использовании модифицированного метода с применением Буфера А и последующим стандартным выделением ДНК из материала набором ДНК-Сорб-В отмечалось значительное повышение количества положительных реакций при обнаружении провируса ВЛКРС. Из 70 проб крови в 42 были обнаружены ДНК мишени, что составляет 60% от общего числа проб.

Выводы. Усовершенствованным методом удалось дополнительно обнаружить 29 положительно реагирующих образцов (41,4%), что существенно повышает качество проводимых исследований с использованием метода ПЦР и позволяет провести более эффективные и корректные клинико-диагностические исследования.



НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЁЗА ИЗ ГРУППЫ СПЕКТРООБРАЗУЮЩИХ МОЛЕКУЛ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ ПРИ ЛИНЕЙНОЙ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

И.А. Рябинин, Н.В. Васильева

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Ключевые слова: *Aspergillus spp.*, белки, инвазивный аспергиллез, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, пептиды, экспресс-диагностика

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-223>

NOVEL BIOMARKERS OF INVASIVE ASPERGILLOSIS CAUSATIVE AGENTS FROM SPECTRA-FORMING MOLECULES REVEALING BY LINEAR MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

I.A. Ryabinin, N.V. Vasilyeva

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

Key words: *Aspergillus spp.*, express diagnostics, invasive aspergillosis, MALDI-TOF mass-spectrometry, peptides, proteins

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-223>

Введение. Современный быстрый метод диагностики инвазивного аспергиллёза связан с выявлением антигена-галактоманнана, общего для всех представителей рода. Однако для подбора эффективной противогрибковой терапии для подтверждения диагноза необходимо не только выявление антигена, но и видовая идентификация *Aspergillus spp.* В связи с этим необходима разработка метода, позволяющего проводить одновременную индикацию возбудителя и его идентификацию (по масс-спектрометрическим параметрам).

Цель исследования. Поиск новых биомаркеров для экспресс-диагностики аспергиллёза среди спектрообразующих молекул из клеточных экстрактов *Aspergillus spp.*, исследованных методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Материалы и методы. MALDI-масс-спектры коллекционных штаммов *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. nidulans* и *A. oryzae* для анализа выкопировали из масс-спектрометрического банка НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (>700 съемок по грибам рода *Aspergillus*). Из банка извлекли масс-спектры, полученные в результате наиболее удачных измерений. Аннотирование масс-спектров с анализом «уникальности» образующих его белков

и пептидов провели с использованием ресурсов TagIdent, UniProt-KB, TrEMBL, pBLAST и данных геномов по микромицетам указанных видов.

Результаты. Для основного возбудителя аспергиллёза — *A. fumigatus* удалось выявить уникальные видоспецифичные пептиды и лёгкие белки со следующими молекулярными массами: 3,2 kDa; 3,9 kDa; 4,7 kDa; 6,0 kDa; 6,1 kDa; 7,5 kDa (2); 7,6 kDa (2). Аналогичные данные для *A. terreus*: 6,0 kDa; 7,4 kDa; 9,2 kDa; 12,0 kDa. Для *A. clavatus* — 3,6 kDa; 4,5 kDa; 5,9 kDa; 6,0 kDa; 6,1 kDa (2); 6,6 kDa; 7,7 kDa; 7,8 kDa (2); 9,9 kDa; 11,1 kDa. Для *A. Oryzae* — 4,0 kDa (2); 6,6 kDa; 7,7 kDa (2); 14,0 kDa. Больше всего таких соединений — 33 — обнаружили в экстракте из культуры *A. nidulans*.

Выводы. Полученные белковые и пептидные маркеры являются основой для создания диагностического протокола экспресс-обнаружения *Aspergillus* spp. по их метаболитам в сыворотке крови пациентов физико-химическими методами. В той же степени кодирующие их последовательности (открытые рамки считывания) следует рассматривать в качестве перспективных мишеней для разработки мультиплексного набора реагентов, основанного на ПЦР.



РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЁТА РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА И СЕРОМОНИТОРИНГА ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

П.В. Филатов¹, А.Г. Полтавченко¹, А.В. Ерш¹, Н.Д. Ушкаленко¹,
К.С. Кунгурцев², А.К. Гунгер²

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет», Новосибирск

Ключевые слова: ортопоксвирусы, быстрое выявление, дот-иммуноанализ, компьютерный учёт результатов

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-225>

DEVELOPMENT OF SOFTWARE FOR THE QUANTITATIVE ACCOUNTING OF RESULTS OF PRIMARY SCREENING AND SEROMONITORING OF ORTHOPOXVIRAL INFECTIONS

P.V. Filatov¹, A.G. Poltavchenko¹, A.V. Ersh¹, N.D. Ushkalenko¹, K.S. Kungurtsev²,
A.K. Gunger²

¹FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

²Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

Key words: orthopoxviruses, rapid detection, dot-immunoassay, computer accounting of results

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-225>

Введение. При интерпретации результатов дот-иммуноанализа возникают ситуации, когда визуально отличить образцы с низким значением интенсивности сигнала от фонового проявления отрицательных образцов достаточно сложно.

Цель исследования. Разработка компьютерной программы для объективной количественной оценки и отсеечения фоновых сигналов при интерпретации результата иммунохимического теста для первичного скрининга и серомониторинга ортопоксвирусных инфекций.

Материалы и методы. Основой теста является описанная ранее методология дот-иммуноанализа на белковых матрицах [1]. Схема анализа и описание методики приведены ранее [2].

Результаты. Методика реализована через спектральный анализ отсканированного изображения, а именно регистрацию значений светоотражения проявившихся точек в рабочей зоне аналитической матрицы. Изображение аналитической матрицы загружается в систему, после чего программа авто-

матически анализирует цветовые характеристики зоны нанесения реагентов. Показатель рассчитывается по шкале от 0 (белый цвет) до 255 (чёрный), то есть по инвертированной шкале Grayscale. Представление результатов анализа может быть в цифровом (абсолютном) значении (при определении пороговых значений, протективных титров антител, при количественном учёте результатов) или в виде клинических результатов («положительно», «отрицательно») в зависимости от варианта тест-системы.

Выводы. Программа «DOTREADER 2000» (номер регистрации RU2020611545) позволяет осуществлять количественную оценку содержания аналитов в исследованных образцах. В программе реализован алгоритм спектральной обработки RGB структуры пятен, позволяющий выявить любое изменение окраски. Большинство пользовательских функций программы выполняются автоматически, а роль пользователя сводится к сканированию аналитической матрицы, вводу полученного изображения и личных данных в программу и печати протокола. Программа нетребовательна к ресурсам, проста в применении и может выполняться оператором с минимальными навыками пользователя ПК.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания.

Литература

1. Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V. et al. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37: 540–554.
2. Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V. et al. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agent. *J. Virol. Meth.* 2016; 236: 231–236.



НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИЯМИ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

Н.А. Аникеева¹, С.В. Терещенко², С.С. Кантутис¹, Н.А. Садомская²,
А.В. Несина², Н.А. Майорова², А.Ю. Лашко², Т.В. Крыгина¹

¹ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Рязань;

²ГБУ РО «ГКБ № 11», Рязань

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, инфекции мочевыводящих путей, дети, уропатогены

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-227>

SOME FEATURES OF THE STRUCTURE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF UROPATHOGENS ISOLATED IN CHILDREN WITH URINARY TRACT INFECTIONS

N.A. Anikeeva¹, S.V. Tereshchenko², S.S. Kantutis¹, N.A. Sadowskaya², A.V. Nesina²,
N.A. Mayороva², A.Yu. Lashko², T.V. Krygina¹

¹Ryazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ryazan, Russia;

²City Clinical Hospital No. 11, Ryazan, Russia

Key words: antibiotic resistance, urinary tract infections, children, uropathogens

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-227>

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) у детей занимают второе место после вирусных респираторных заболеваний. Наиболее часто при ИМВП высеваются представители семейства *Enterobacteriales*. В настоящее время всё большее значение приобретает флора, имеющая детерминанты резистентности к антимикробным препаратам (АМП), в качестве возбудителя ИМВП и у детей.

Цель исследования. Проанализировать спектр микрофлоры и активность АМП у детей с ИМВП.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный локальный мониторинг микробиологического пейзажа мочи с оценкой активности АМП у пациентов, получавших консервативное лечение по поводу ИМВП в педиатрическом отделении ГБУ РО «ГКБ № 11» в 2019 г. ($n = 111$, девочки — 68%, мальчики — 32%, в возрасте от 2 месяцев до 17 лет).

Видовая идентификация возбудителей проводилась микрометодом на микробиологическом анализаторе Labsystems EMS Reader. Фенотипическая методика детекции детерминант резистентности осуществлялась диско-диффузионным методом (ДДМ).

Результаты. В исследование включено 111 микроорганизмов (МО), выделенных из 204 проб мочи. Доминирующими возбудителями являлись *E. coli* (50,4%) и *K. pneumoniae* (14,4%).

Детерминанты резистентности были выявлены у 16 МО (14,4%). Они являлись продуцентами ESBL класса A, у 3 из них выявлены комбинационные механизмы резистентности: ESBL + АГМ ферменты и ESBL + плазмидные AmpC. Основные носители детерминант резистентности — *E. coli* (9%), *K. pneumoniae* (2,7%).

В отношении *E. coli* с обычным фенотипом чувствительности абсолютную активность (100%) демонстрировали цефалоспорины III–IV поколения, аминогликозиды и фосфомицин. В отношении *E. coli*: ESBL и ESBL+АГМф выявлена неэффективность цефалоспоринов III–IV поколения и незащищённых пенициллинов, отмечена 100-процентная активность цефокситина, цефоперазон-сульбактама, карбапенемов, фосфомицина, нитрофурантоинов, аминогликозидов.

В отношении *K. pneumoniae* с обычным фенотипом чувствительности проявляли высокую активность (100%) цефалоспорины III–IV поколения, аминогликозиды, цефокситин и цефоперазон-сульбактам. *K. pneumoniae* ESBL, ESBL+AmpC была абсолютно резистентна к цефалоспорином III–IV поколения, пенициллинам, но обладала высокой чувствительностью к цефокситину, цефоперазон-сульбактаму, карбапенемам и аминогликозидам (100%).

Выводы. Доминирующими возбудителями ИМВП у детей являлись *E. coli* (50,4%) и *K. pneumoniae* (14,4%). Детерминанты резистентности были выявлены у 14,4% возбудителей. Основными носителями приобретённых механизмов резистентности являлись *E. coli* (9%), *K. pneumoniae* (2,7%). В отношении *E. coli* и *K. pneumoniae* с обычными фенотипами чувствительности наибольшую активность демонстрировали цефалоспорины III–IV поколения, аминогликозиды. В отношении уропатогенов, обладающих механизмами резистентности, выявлена абсолютная неэффективность цефалоспоринов III–IV поколения и незащищённых пенициллинов, отмечена высокая активность цефокситина, цефоперазон-сульбактама, карбапенемов и аминогликозидов.



РОЛЬ ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ В СНИЖЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГОНОКОККА К АНТИБИОТИКАМ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

И.Н. Бодоев, М.В. Малахова, О.В. Побегуц, И.О. Бутенко, А.И. Манолов, И. Алтухов, В.Г. Згода, Е.Н. Ильина, В.М. Говорун

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, Москва

Ключевые слова: периплазматические шапероны, *Neisseria gonorrhoeae*, антибиотикорезистентность

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-229>

THE ROLE OF PERIPLASMIC CHAPERONS IN FORMATION OF REDUCED SENSITIVITY OF THE GONOCOCCUS TO BROAD-SPECTRUM ANTIBIOTICS

I.N. Bodoev, M.V. Malahova, O.V. Pobeguts, I.O. Butenko, A.I. Manolov, I. Altuhov, V.G. Zgoda, E.N. Ilina, V.M. Govorun

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Key words: periplasmic chaperones, *Neisseria gonorrhoeae*, antibiotic resistance

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-229>

В ходе исследования периплазматических шаперонов (ППШ) *Neisseria gonorrhoeae* нами был отобран штамм i19.05 с аминокислотными заменами в ППП SurA (V61A, N105S, A230T) и белке Omp85 (L568R), ответственных за биогенез белков внешней мембраны. Стоит отметить, что данные мутации уникальны и находятся непосредственно в доменной структуре белков, что может влиять на корректность их работы, приводя к изменению белкового состава и свойств клеточной оболочки.

Цель исследования. Определить влияние мутаций в генах *surA* и *omp85* на свойства штамма i19.05.

Материалы и методы. Объектом исследования был клинический изолят гонококка i19.05 с мутациями в генах *surA* и *omp85*. Стоит отметить, что данный изолят не содержал известных детерминант устойчивости, кроме мутантного белка PenA (Asp345a). В качестве контроля и реципиента в опытах по трансформации использовался штамм p01.08, чувствительный ко всем используемым в терапии гонореи антибиотикам. Для каждого штамма был выделен пул белков клеточной оболочки с последующим хромато-масс-спек-

трометрическим (LC-MS/MS) анализом. Для валидации результатов применяли более точный направленный (таргетный) масс-спектрометрический метод анализа (MRM).

Результаты. Был получен трансформант NG05 с использованием спот-трансформации штамма реципиента p01.08 фрагментами ДНК донора i19.05. Опыты по определению МИК свидетельствуют о сниженной чувствительности к пенициллину (MIC = 0,5 мг/л), тетрациклину (MIC = 0,5 мг/л) и азитромицину (MIC = 1,0 мг/л) у мутантных штаммов (i19.05 и NG05).

Сравнительный LC-MS/MS анализ белков клеточных оболочек штамма-реципиента p01.08, изолята i19.05 и трансформанта NG05 показал снижение представленности ПШ SurA в исследуемом изоляте i19.05 и полученном трансформанте, а также увеличение представленности эффлюксных помп. MRM анализ белков исследуемых штаммов выявил увеличение количества двух других ПШ, Skp и FkpA у мутантных штаммов. Дополнительные исследования уровня эффлюкса показали повышенную эффективность помп у трансформанта NG05. Добавление к среде ингибиторов эффлюксных помп приводило к снижению МИК NG05.

Выводы. Исследуемые замены в SurA и Omp85 приводят к увеличению представленности других ПШ и эффлюксных помп, ответственных за формирование устойчивости к антибиотикам широкого спектра действия.



ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ КЛАССА ИНТЕРНАЛИНОВ У ШТАММОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Т.В. Илларионова¹, Е.К. Псарева¹, Е.А. Потемкин¹, С.А. Ермолаева^{1,2}

¹Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», Нижний Новгород;

²ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Минздрава России, Москва

Ключевые слова: *Listeria*, листериоз, интерналины

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-231>

VARIABILITY OF GENES ENCODING PROTEINS OF THE INTERNALIN CLASS IN *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS

T.V. Illarionova¹, E.K. Psareva¹, E.A. Potemkin¹, S.A. Ermolaeva^{1,2}

¹Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia;

²N.F. Gamaleya NRCM, Moscow, Russia

Key words: *Listeria*, listeriosis, internalins

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-231>

Введение. Листериоз является одним из инфекционных заболеваний пищевого происхождения у людей и животных. Возбудителем заболевания является *Listeria monocytogenes*, способная проникать в клетку-хозяина благодаря лиганд-рецепторному взаимодействию. Функцию лигандов у листерий выполняют поверхностные протеины: интерналины A (InlA) и InlB, принадлежащие к семейству LPXTG-протеинов. InlA состоит из 800 аминокислотных остатков. InlB — протеин, содержащий богатые лейцином повторы, имеет 630 аминокислотных остатков. К семейству интерналинов листерий относят и InlC, содержащий 297 аминокислотных остатков. Белки семейства интерналинов характеризуются наличием так называемого интерналинового домена. В структуре интерналинового домена за короткой N-сar областью следуют лейцин-богатые повторы (leucine-rich repeat, LRR) и так называемая IR-область. Интерналины запускают процесс проникновения бактерий путем взаимодействия с рецептором фактора роста гепатоцитов (Met) и двумя другими клеточными компонентами: рецептором к глобулярному домену C1q(gC1q-R) и протеогликанами. Белок InlA имеет молекулярную массу 88 кДа и участвует в инвазии листерий в эпителиальные клетки. Интерналин B, белок клеточной стенки с молекулярной массой 65 кДа, необходим для инвазии бактерий в гепатоциты,

но не эпителия кишечника. Экспрессия генов *inlA* и *inlB*, кодирующих белки класса интерналинов, отражает специфику клеточного тропизма листерий.

Цель исследования. Изучение вариабельности генов, кодирующих белки класса интерналинов у штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из различных источников.

Результаты. В настоящей работе было проведено исследование 69 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из образцов грызунов (11,6%), крупного рогатого скота (15,9%), мелкого рогатого скота (17,39%), человека (14,5%), пищевых продуктов (21,7%), насекомых (4,35%), свиней (11,59%), разлагающихся растительных остатков (1,45%) и лошади (1,45%). Анализ генов проводили при помощи ПЦР с синтезированными праймерами для участков генов интерналинов *inlA*, *inlB*, *inlC* и *inlE*. Затем осуществляли выделение и очистку ДНК от примесей компонентов ПЦР. Полученные фрагменты секвенировали и далее анализировали с помощью программ Chromas и ClustalX.

Всего было обнаружено десять аллельных вариантов гена *inlA*, девять — *inlB*, десять — *inlC* и шесть — *inlE*. Среди аллельных вариантов *inlA* преобладал аллель 4 (43,5%), среди *inlB* — аллель 14 (50%), *inlC* — аллель 6 (67,6%), *inlE* — аллель 8 (54,4%).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о свойствах вирулентности и инвазивности исследованных штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из различных источников, и позволяют сделать вывод о циркуляции патогена одного вида во всевозможных средах его обитания.



РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI*, СОДЕРЖАЩИЕ АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ИНТЕРНАЛИН А *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Ю.С. Кокурина¹, Е.К. Псарева¹, Я.М. Чаленко^{1,2}, С.А. Ермолаева^{1,2}

¹Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», Нижний Новгород;

²ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, Москва

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, ген *inlA*, интерналин А

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-233>

RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* STRAINS CONTAINING ALLELIC VARIANTS OF GENE ENCODING *LISTERIA MONOCYTOGENES* INTERNALIN A PROTEIN

Yu.S. Kokurina, E.K. Psareva, Ya.M. Chalenko, S.A. Ermolaeva

¹Nizhny Novgorod Institute Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

²N.F. Gamaleya NRCEM, Moscow, Russia

Key words: *Listeria monocytogenes*, *inlA* gene, internalin A

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-233>

Введение. В настоящее время актуально изучение пищевого патогена *Listeria monocytogenes*, вызывающего гастроэнтерит, менингит и abortивные процессы как у людей, так и у сельскохозяйственных животных. Микроорганизм обладает множеством факторов вирулентности, которые позволяют ему заражать, выживать и размножаться в различных типах клеток-хозяев. Основным фактором вирулентности для проникновения в эпителиальные клетки является белок интерналин А (InlA). Он впервые был описан в 1991 г. и представляет собой ковалентно связанный белок клеточной стенки бактерий. В процессе инвазии токсин связывается с молекулой адгезии, экспрессирующейся на поверхности эпителиальной клетки-мишени Е-кадгерин, после чего происходит активное проникновение бактерии в клетку.

Цель исследования. Получение рекомбинантных штаммов *E. coli* JM109, содержащих разные аллельные варианты гена *inlA*, для дальнейшего изучения изогенных штаммов *L. monocytogenes*.

Материалы и методы. В работе использовали четыре аллельных варианта гена *inlA* *L. monocytogenes* из государственной коллекции микроорганизмов на

базе ФГБНУ ФИЦВиМ: штамм К-23 — продуцент аллеля 1 гена *inlA*, штамм 24618 — аллеля 4, штамм К-17 — 9 и референтный штамм EDEG — аллель 3. Штаммы инактивировали лизоцимом и протеиназой К. Полученную ДНК использовали для ПЦР. Проведено лигирование молекулы вектора pGEM®-T Easy (содержащий ген устойчивости к ампициллину) и каждого из фрагментов гена *inlA* и трансформация полученной плазмиды в культуры *E. coli* JM109.

Результаты. Полученные рекомбинантные штаммы *E. coli* JM109 с содержанием аллельных вариантов гена, кодирующего белок интерналин А *L. monocytogenes*, выращивали на плотной питательной среде LB с добавлением ампициллина до концентрации 150 мкг/мл. Нуклеотидная последовательность каждого аллельного варианта гена *inlA* у рекомбинантных клонов идентична последовательности референтного гена, представленного в международной базе данных GeneBank.

Выводы. Дальнейшие исследования на моделях полученных клонов будут направлены на получение природных изогенных рекомбинантных штаммов *L. monocytogenes*, содержащих аллельные варианты гена *inlA*, для изучения биологической активности фактора патогенности листерий в системах *in vitro* и *in vivo*.



ВОЗРАСТАНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ НЕПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА H5N3 ПРИ АДАПТАЦИИ К МЫШАМ

Н.Ф. Ломакина¹, Т.А. Тимофеева¹, И.А. Руднева¹, А.В. Ляшко¹, О.Л. Воронина¹,
Е.И. Аксёнова¹, Н.Н. Рыжова¹, М.С. Кунда¹, А.А. Трещалина², А.С. Гамбарян²

¹ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, Москва;

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва

Ключевые слова: вирус гриппа А, слабовирулентный грипп H5, адаптационные мутации

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-235>

INCREASING VIRULENCE OF NONPATHOGENIC INFLUENZA VIRUS H5N3 DURING ADAPTATION FOR MICE

N.F. Lomakina¹, T.A. Timofeeva¹, I.A. Rudneva¹, A.V. Lyashko¹, O.L. Voronina¹,
E.I. Aksenova¹, N.N. Ryzhova¹, M.S. Kunda¹, A.A. Treshchalina², A.S. Gambaryan²

¹N.F. Gamaleya NRCM, Moscow, Russia;

²Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia

Key words: influenza A virus, low pathogenic influenza H5, adaptive mutations

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-235>

Введение. В 2019 г., по данным международного эпизоотического бюро (МЭБ), в 24 странах мира были зарегистрированы случаи гибели домашних и диких птиц от высокопатогенного гриппа H5.

За десятилетний период мониторинга вирусов гриппа (ВГ) на пруду в Москве в период осенней миграции от диких уток были выделены вирусы подтипов H1N1, H1N2, H3N1, H3N2, H3N6, H3N8, H4N6, H6N2, H11N9 и H5N3. Высокая изменчивость, реассортация генов ВГ, преодоление межвидового барьера при инфицировании птиц и млекопитающих, присутствующих на пруду, могут стать причиной возникновения новых вариантов гриппа с непредсказуемыми последствиями. В первую очередь это касается вирусов гриппа H5.

Цель исследования. Выяснить потенциальную биологическую угрозу выделенных вирусов гриппа подтипа H5N3 для млекопитающих.

Материалы и методы. С целью выяснения потенциальной биологической угрозы выделенных вирусов H5N3 для млекопитающих изолят А/утка/Москва/4182/2010 (H5N3) пассировали на мышах при интраназальном заражении гомогенатом из лёгких инфицированных мышей и провели полногеномное секвенирование исходного и адаптированного к мышам вируса.

Результаты. Исходный вирус в дозе $10^{8,9}$ ЭИД₅₀ (титр по инфекционности для КЭ) оказался непатогенным для мышей. На 7-м пассаже в лёгких мышей наблюдали характерные признаки инфекции. После 10-го пассажа заражение дозами от $10^{3,8}$ до $10^{7,8}$ ЭИД₅₀ приводило к гибели от 14 до 100% особей.

Анализ вирусных белков благодаря интернет-ресурсу (<http://www.fludb.org>) не обнаружил маркеров патогенности в исходном изоляте, филогенетически отдалённом от высоковирулентных вирусов гриппа H5.

В адаптированном к мышам вирусе после 10-го пассажа произошли аминокислотные замены в вирусных белках HA (K51R в HA2), NA (S59I), NP (R65K), PB2 (E627K), PB1 (V113A) и PB1-F2 (S82P). Обнаруженные мутации в HA, NA и PB1-F2 — уникальные. В поверхностных белках HA и NA они расположены в стержневом участке трёхмерной структуры этих голоферментов и могут влиять на проникновение и выход вируса из клетки. Мутация в PB1 (V113A) характерна для ВГ млекопитающих и, по-видимому, адаптационная. Мутация E627K в полимеразе PB2 — известная детерминанта патогенности для мышей.

Выводы. Учитывая, что непатогенный вирус А/утка/Москва/4182/2010 (H5N3) удалось адаптировать к мышам с изменением его вирулентности в условиях искусственного отбора, маловероятно, что подобное может произойти в естественных условиях. Тем не менее такой ход событий нельзя исключать.



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ И КОНТРОЛЬ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В СОМАТИЧЕСКИХ СТАЦИОНАРАХ

Т.А. Семененко¹, Э.В. Жукова¹, Т.П. Говтянская¹, А.А. Бурова²

¹ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, Москва;

²ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница имени И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва

Ключевые слова: *контроль антибиотикорезистентности, микробиология, антибиотикотерапия*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-237>

MICROBIOLOGICAL MONITORING AND CONTROL OF ANTIBIOTIC REZISTENCE IN SOMATIC HOSPITALS

T.A. Semenenko¹, E.V. Zhukova¹, T.P. Govtyanskaya¹, A.A. Burova²

¹N.F. Gamaleya NRCEM, Moscow, Russia;

²City Clinical Hospital named after I.V. Davydovsky, Department of Health of the City of Moscow, Moscow, Russia

Key words: *control of antibiotic rezistens, microbiology, antibiotic therapy*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-237>

Введение. Неадекватная, нередко избыточная антибиотикотерапия (АБТ) приводит в совокупности с действием других факторов внутрибольничной среды к селекции штаммов микроорганизмов с повышенной устойчивостью к антимикробным препаратам (АМП). Сложившаяся ситуация требует организации контроля за антибиотикочувствительностью и принятия мер по снижению резистентности к антимикробным средствам в различных отделениях многопрофильных стационаров.

Цель исследования. Бактериологический мониторинг и локальный контроль антибиотикорезистентности, необходимые для этиологической расшифровки инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), выявления госпитальных штаммов бактерий, динамической оценки и коррективы АБТ, своевременной коррекции лекарственных формуляров, при тесном взаимодействии клинических микробиологов, клинических фармакологов, госпитальных эпидемиологов.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 6574 пациента различных отделений многопрофильных больниц, у которых проводилась оценка бактериальной контаминации возбудителями ИСМП и стратификация их

по риску полирезистентных «эскейп»-патогенов с определением антибиотико-чувствительности и использованием компьютерных программ, а также текущий аудит лечения антибиотиками, разработка и внедрение протоколов стартовой эмпирической антибиотикотерапии для больных различных отделений с разными рисками.

Результаты. Установлен высокий риск обнаружения в составе микрофлоры, выделенной из биоматериала различных локусов больных, резистентных к антибиотикам штаммов представителей семейства кишечных БЛРС+, НФГО бактерий, Gr+ кокковой флоры (ORSA, ORSE). Показана высокая частота распространения штаммов клебсиелл БЛРС+, а также риск появления продуцентов карбапенемаз расширенного спектра, прежде всего в ОРИТ, где и происходит селекция полирезистентных к антимикробным препаратам штаммов и откуда доказан риск распространения таких штаммов в другие профильные отделения. КРС и карбапенем-резистентные патогены являются наиболее эпидемиологически значимыми как возбудители ИСМП, представляют крайне сложную проблему для лечения тяжелых инфекций и особенно актуальны для отделений, массово использующих мощную антимикробную терапию.

ГОНБ представлены синегнойной палочкой и ацинетобактером, которые характеризуются природной устойчивостью к АМП и быстрым нарастанием антибиотикоустойчивости в госпитальных условиях. Они относятся к числу бактериальных агентов с высоким эпидемическим потенциалом и могут в короткие сроки формировать госпитальные штаммы, вызывать вспышки. ГОНБ являются серьёзной проблемой для стационаров разного профиля, особенно ОРИТ, ожоговых отделений, отделений хирургического профиля. Биоплёнки, образуемые синегнойной палочкой, защищают бактерии как от естественных защитных факторов организма пациентов, так и от неблагоприятного воздействия внутрибольничной среды. Они способствуют обеспечению устойчивости синегнойной палочки к антибиотикам и дезинфектантам. Наиболее быстрое формирование биоплёнок происходит на поверхностях сосудистых и мочевых катетеров, интубационных трубок, искусственных клапанов сердца, других кардиоваскулярных имплантов.

Грамположительная микрофлора представлена золотистым стафилококком (21,7–25,6% в общем спектре). Причём среди штаммов золотистого стафилококка от 10,8% до 17,2% составляет оксациллин (метициллин)-резистентный золотистый стафилококк (ORSA). Он устойчив ко всем бета-лактамам антибиотикам и чувствителен только к гликопептидам (ванкомицину). Значительно меньший удельный вес приходится на эпидермальный стафилококк. Но среди его изолятов обращает внимание высокий удельный вес оксациллин (метициллин)-резистентного эпидермального стафилококка (ORSE), составляющего

в отдельные годы до 50,7% от общего числа таких штаммов. Штаммы ORSE также устойчивы ко всем бета-лактамам и чувствительны только к гликопептидам (ванкомицину).

Наибольший процент ORSA и ORSE выявлен в отделениях гнойной хирургии, где в ходе мониторинга раневой микрофлоры наблюдали возникновение ИСМП в виде суперинфекции гнойных ран и язв. При этом среди выделенных из раневого отделяемого штаммов стафилококков резистентные к антибиотикам изоляты (ORSA и ORSE) встречались в 46,2% случаев, что значительно выше ($p < 0,001$) процента резистентных стафилококков, выделенных из очагов острой гнойной инфекции мягких тканей.

Другой тип эпидемического процесса ИСМП в этих отделениях связан с ампутацией нижних конечностей на уровне бедра по поводу ишемической гангрены с формированием культи и наложением швов. При этом наблюдали нагноение раны ампутационной культи. Микрофлора пациентов с нарушением заживления культи также была представлена в том числе ORSA и ORSE, но отличалась значительно меньшим их удельным весом и меньшим процентом полиантибиотикорезистентных штаммов.

В общем спектре грамположительной микрофлоры до 17,0% составляют энтерококки, занимающие важную позицию в структуре грамположительных бактерий. Однако среди этих изолятов нами не обнаружены ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE), несмотря на известную тенденцию к росту колонизации ими пациентов стационаров, нацеленность и настороженность врачей всех специальностей в отношении данного возбудителя ИСМП.

Немаловажным является принятие стратегии ограничения использования АМП. При этом каждое назначение препаратов должно согласовываться с экспертом по антимикробной терапии. После назначения АМТ этот специалист осуществляет контроль адекватности терапии и вносит необходимые коррективы. Однако для эффективной работы этого специалиста требуется адекватная нагрузка, которая труднодостижима в реальной практике. Отсюда необходимо внедрение информационных технологий и обеспеченность специалистов компьютерными программами для оценки ранней эффективности антибиотикотерапии, быстрого принятия решения в критические моменты применения АМТ, модификации терапии на основании микробиологических данных, отмены АМТ и др.

Выводы. В результате выполнена стартовая исходная оценка применения АМП до внедрения стратегии контроля использования антибиотиков и через 6 месяцев, разработка и внедрение на основе результатов изучения локальной устойчивости к АБИ у пациентов с разными рисками, организованы административный контроль и подготовка нормативно-директивных материалов

по организационным мерам внедрения программы постоянного контроля АБТ и обучения специалистов разных отделений рациональному применению АБТ.

Важнейшая роль микробиологических исследований в контроле ИСМП и высокий уровень антибиотикорезистентности внутрибольничных патогенов ставят задачу применения методов молекулярной генетики и разработки эффективных доступных фенотипических методов для внутривидового типирования госпитальных штаммов.



ВИРУЛЕНТНОСТЬ УРОПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI*, НЕСУЩИХ ГЕНЫ *hlyA* И *cnf1*, ДЛЯ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA*

П.В. Слукин, Л.В. Колупаева, Н.А. Слукина, Н.Н. Подгорная, Н.К. Фурсова

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

Ключевые слова: уропатогенные *Escherichia coli*, гены вирулентности, *hlyA*; *cnf1*, *Galleria mellonella*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-241>

VIRULENCE OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* CARRYING *hlyA* AND *cnf1* GENES FOR *GALLERIA MELLONELLA* LARVAE

P.V. Slukin, L.V. Kolupaeva, N.A. Slukina, N.N. Podgornaja, N.K. Fursova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Key words: uropathogenic *Escherichia coli*, virulence genes, *hlyA*; *cnf1*, *Galleria mellonella*

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-241>

Введение. Личинки большой восковой моли *Galleria mellonella* широко используются для оценки вирулентности уропатогенных *Escherichia coli* (УПЭК). Ранее на этой модели было показано, что вирулентность УПЭК зависит от структуры их липополисахарида (Alghoribi *et al.*, 2014). Однако вопрос о влиянии урологических токсинов на вирулентность УПЭК остаётся открытым.

Цель исследования. Определить уровень вирулентности штаммов УПЭК, несущих гены *hlyA* α-гемолизина и *cnf1* цитотоксического некротического фактора, для личинок *G. mellonella*.

Материалы и методы. Штаммы *E. coli* ($n = 87$) получены из урологических клиник Москвы и Ярославля, идентифицированы на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Гены *hlyA* и *cnf1* детектировали в термолизатах культур УПЭК методом ПЦР со специфичными праймерами. Вирулентность штаммов для личинок *G. mellonella* оценивали по величине LD_{50} , согласно Alghoribi *et al.*, 2014.

Результаты. Гены *hlyA* детектированы в 16 штаммах УПЭК, *cnf1* — в 11 штаммах, оба гена одновременно — в 17 штаммах. По уровню LD_{50} для личинок *G. mellonella* изучаемые штаммы подразделены на две группы: вирулентные с $LD_{50} \approx 10^5$ – 10^6 КОЕ ($n = 72$) и слабо вирулентные с $LD_{50} \approx 10^7$ КОЕ ($n = 15$). В первой группе штаммов ген *hlyA* выявлен у 5 штаммов, гены *hlyA+cnf1* — у 11. Во второй группе штаммов гены *cnf1* и *hlyA* не обнаружены.

Выводы. Гены *hly*_{AI} *cnf1*, кодирующие α-гемолизин и цитотоксический некротический фактор УПЭК, обнаружены в геномах штаммов с более высоким уровнем LD₅₀ для личинок *G. mellonella*, что позволяет высказать предположение о вкладе продуктов данных генов в фенотип вирулентности. Однако отсутствие этих генов у значительной части штаммов, проявляющих соизмеримый уровень вирулентности на данной животной модели, указывает на наличие других механизмов вирулентности.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.



МОНИТОРИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДИРОФИЛЯРИОЗА И ТУЛЯРЕМИИ В КОМАРАХ МЕТОДОМ ПЦР НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

О.Ю. Старостина¹, Г.В. Берёзкина¹, Т.С. Рязанова¹, С.Ю. Зеликман^{1,2},
А.В. Свердлова¹, В.В. Якименко¹, А.Х. Нурпейсова^{1,2}

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, Омск;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск

Ключевые слова: комары, дирофиляриоз, туляремия, *Dirofilaria repens*, *Francisella tularensis*, Омская область, ДНК

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-243>

MONITORING OF *DIROFILARIA* AND *FRANCISELLA TULARENSIS* IN MOSQUITO BY PCR IN THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA

O.Yu. Starostina¹, G.V. Berezkina¹, T.S. Ryazanova¹, S.Yu. Zelikman^{1,2}, A.V. Sverdlova¹,
V.V. Yakimenko¹, A.H. Nurpeisova^{1,2}

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia;

²Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Key words: mosquitoes, dirofilariasis, tularemia, *Dirofilaria repens*, *Francisella tularensis*, Omsk region, DNA

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-243>

Введение. Кровососущие комары являются потенциальными переносчиками возбудителей целого ряда опасных для человека природно-очаговых инфекций и инвазий, в том числе дирофиляриоза и туляремии. Молекулярный мониторинг заражённости комаров с использованием метода ПЦР позволяет в короткие сроки исследовать большое число переносчиков, определить территории высокого риска, эпидемиологически значимые виды переносчиков, эффективность противоэпидемических мероприятий.

Цель исследования. Оценка применения метода ПЦР для энтомологического мониторинга ДНК возбудителей дирофиляриоза и туляремии.

Материалы и методы. Всего собрано 4883 комара более 10 видов, относящихся к 3 родам, из которых сформировали 987 пулов в среднем по 5 особей в пуле (1–6 особей). ДНК возбудителей дирофиляриоза и туляремии определяли методом ПЦР с видоспецифическими праймерами с детекцией методом электрофореза. Индивидуальную заражённость комаров вычисляли с использованием таблиц, предложенных А.А. Тагильцевым с соавт. (1990) и рассчитанных исходя из распределений редких событий по Пуассону.

Комаров собирали в летние месяцы 2017 и 2019 гг. в двух северных районах Омской области (Большеуковский и Знаменский), одном южном (Щербакульский) и в рекреационной зоне (Омский район).

Результаты. Генетические маркеры *Dirofilaria repens* выявлены в $1,9 \pm 0,8\%$ пулов комаров (*Ochlerotatus* гр. *communis*), отловленных в лесной зоне Знаменского района (индивидуальная заражённость 0,4%), в $1,5 \pm 0,7\%$ проб комаров (*O.* гр. *communis*, *Ae. cynerius*) лесной зоны Щербакульского района и в $0,8 \pm 0,8\%$ пулов комаров (*O. excrucians*), отловленных в р.п. Щербакуль. Рассчитанная индивидуальная заражённость переносчиков в Щербакульском районе — 0,2%. Высокая заражённость переносчиков отмечена в с. Троицкое Омского района: ДНК *Dirofilaria repens* обнаружена в 4 из 16 пулов комаров. В 3 пулах были комары *O. caspius*, в 1 — *O. dorsalis*. Генетические маркеры *Dirofilaria immitis* в исследованных пробах не выявлены.

ДНК *Francisella tularensis* обнаружена в $1,0 \pm 0,6\%$ пулов комаров (*p. Aedes* гр. *communis*), отловленных в Знаменском районе (индивидуальная заражённость 0,2%), все остальные пробы были отрицательными.

Выводы. Продемонстрирована эффективность ПЦР с использованием видовых праймеров для изучения заражённости комаров возбудителями природно-очаговых инфекций и инвазий на территориях вероятного риска заражения.



ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА

Т.Н. Суборова, С.А. Свистунов, А.А. Кузин, О.П. Сидельникова

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург

Ключевые слова: бактериемия, пациенты, стационар, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-245>

STUDY OF BACTEREMIA PATHOGENS SPECTRUM IN VERSATILE HOSPITAL PATIENTS

T.N. Suborova, S.A. Svistunov, A.A. Kuzin, O.P. Sidelnikova

Military Medical Academy of S.M. Kirov, St. Petersburg, Russia

Key words: bacteremia, patients, hospital, infections associated with medical care

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-245>

Введение. Несмотря на достижения медицины в борьбе с инфекциями, связанные с оказанием медицинской помощи, сепсис по-прежнему остаётся одной из наиболее сложных общемедицинских проблем. Бактериемия является одним из возможных признаков сепсиса.

Цель исследования. Изучение спектра возбудителей бактериемии у пациентов многопрофильного стационара.

Материалы и методы. Анализ спектра клинических изолятов, выделенных из крови пациентов многопрофильного стационара в 2017–2019 гг., и определение чувствительности к антимикробным препаратам проводили с помощью автоматических анализаторов Bact/Alert (bioMérieux, Франция) и Vitek-2 (bioMérieux, Франция).

Результаты. Среди возбудителей, выделенных из крови пациентов, обнаруживались коагулазонегативные стафилококки (КОС), *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*, при этом число изолятов постоянно нарастало. При исследовании образцов крови пациентов в 2017 г. было получено 215, в 2018 г. — 364, в 2019 г. — 791 гемокультура. Среди 1370 выделенных за этот период клинических изолятов преобладали грамположительные бактерии (ГПБ), доля которых составила 53,9% ($n = 739$). Доля грамотрицательных бактерий (ГОВ) составила 41,2% ($n = 564$). Бактерии чаще выделяли из крови пациентов хирургических отделений стационара. Так, в 2017 г. доля таких изолятов составила 58,6%, в 2018–2019 гг. — 61–62%. Доля гемокультур, полученных от пациентов терапевтических отделений, колебалась на уровне 30–40%. В 2017 г.

среди гемокультур преобладали штаммы *Klebsiella pneumoniae* (33%), которые выделялись чаще, чем наиболее распространённые возбудители бактериемии — КОС (21%). Высокими оказались также доли *Pseudomonas aeruginosa* (10,2%) и *Acinetobacter baumannii* (5,6%). Данные микробиологического мониторинга позволили установить, что среди штаммов *Klebsiella pneumoniae* были распространены антибиотикоустойчивые штаммы. Так, чувствительными к цефалоспорином 3–4-го поколений были только 4–6% изолятов. Чувствительность к аминогликозидам составляла 30%, к ципрофлоксацину — 6%. Не более 23% изолятов сохраняли чувствительность к имипенему и меропенему.

Выводы. Выявление спектра лидирующих возбудителей даёт основание для совершенствования схем рациональной антимикробной терапии.



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВИРУСА ЯЩУРА

Н.И. Хаммадов¹, А.И. Хамидуллина², К.В. Усольцев¹, Т.Х. Фаизов¹

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань;

²ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», Казань

Ключевые слова: вирус ящура, тип, штамм, полиморфизм генома

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-247>

GENETIC POLYMORPHISMS OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS

N.I. Khammadoov¹, A.I. Khamidullina², K.V. Usoltsev¹, T.Kh. Faizov¹

¹Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia;

²Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russia

Key words: foot and mouth disease virus, type, strain, genome polymorphism

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-247>

Введение. Вирус ящура содержит РНК и относится к роду *Aphthovirus*, семейству *Picornaviridae*. Вирус включает в себя серотипы: А, Asia-1, С, О, и SAT (1, 2, and 3). Ящур является патогенным более чем для 100 видов домашних и диких животных, а также для человека. Помимо очевидной клинической картины, при выявлении ящура активно используются лабораторные методы диагностики.

Цель исследования. Поиск универсальных консервативных геномных локусов, присутствующих во всех типах вируса ящура, для использования в качестве генетических маркеров для ПЦР-детекции вируса.

Материалы и методы. Нуклеотидные последовательности искомого вируса определялись путём поиска в базах NCBI. Штаммовое разнообразие обнаруженного ящура с использованием анализируемого генетического маркера определяли с помощью утилиты nBLAST, а нуклеотидные последовательности праймеров и зондов проектировали с помощью программы Vector NTI.

Результаты. Выявление гомологии штаммов/изолятов всех серотипов вируса ящура позволило определить локус с минимальной вариабельностью (в тексте это третий локус). В этом локусе в геноме вируса GTA/3/2002 (GenBankIDMH053318) олигонуклеотиды занимают следующие позиции: прямой праймер 7913–7934 п.н. (atctccgtggcaggactcgc), обратный праймер 8026–8043 п.н. (tgggtgaacgccgtgtgc) и зонд 7988–8024 п.н. (tttgagattccaagctacagatcactttacctgc). Индикация всех штаммов/изолятов вируса ящура достигается с помощью

двух модификаций зонда: 1. «PasFMDV» (ttcgagataccaagctacagatcgctctacctgc) позволяет обнаруживать два изолята, не обнаруженные вирусами основного зонда; 2. «PsatFMDV» (tttgagatccctagctacagatcactttacctgc) учитывает особенности полиморфизма девяти изолятов серотипа SAT1 и SAT2 и одного из серотипа А.

Выводы. Анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей геномов различных штаммов/изолятов вируса ящура в каждом серотипе выявил локус, характеризующийся максимальным консерватизмом. В последовательности олигонуклеотидов достаточный уровень полиморфизма в геномах изолятов вируса был обнаружен только в отношении зонда ПЦР (в 12 изолятах серотипами А, Asia1, SAT1 и SAT2); влияние такой изменчивости на количество обнаруженных вирусных изолятов позволяет модифицировать зонд ПЦР.



СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОЛИМФЫ И ТОТАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ КЛЕЩЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ НА НАЛИЧИЕ ДНК РИККЕТСИЙ

С.В. Штрек^{1,2}, И.Е. Самойленко¹, Г.В. Берёзкина¹

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, Омск;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск

Ключевые слова: риккетсии, ПЦР, клещи, гемолимфа

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-249>

COMPARATIVE STUDY OF HEMOLymph AND TOTAL SUSPENSION OF TICKS BY MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR THE PRESENCE OF DNA FROM RICKETTSIA

S.V. Shtrek^{1,2}, I.E. Samoylenko¹, G.V. Berezkina¹

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia;

²Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Key words: rickettsia, PCR, ticks, hemolymph

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-249>

Цель исследования. Сравнение результатов исследования гемолимфы и тотальной суспензии клещей на наличие ДНК риккетсий методом ПЦР.

Методы. Для эксперимента отобрали 11 имаго клещей: две частично напивавшиеся (в течение 3 дней) самки *I. persulcatus* из лабораторной линии клещей, заражённых *Candidatus R. tarasevichiae*, 7 клещей (пол не определён) *D. nuttalli*, собранных на территории Красноярского края в 2019 г., и две самки *D. marginatus* из природного очага клещевого риккетсиоза в Называевском районе Омской области, собранных в 2015 г. Клещей исследовали индивидуально. В целях поверхностной дезинфекции переносчиков отмывали в 70-процентном спирте, а затем тщательно промывали стерильным физиологическим раствором. Для выделения ДНК использовали набор реагентов «РеалБест экстракция 100» («Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции. В пробирки типа эппендорф с лизирующим раствором вносили каплю гемолимфы, полученную после отсечения лапки. Для приготовления суспензии клещей измельчали ножницами, а после в стерильной пробирке растирали пестиком. К растёртым переносчикам добавляли необходимое количество раствора для подготовки образцов, прилагаемого в наборе.

Для определения наличия ДНК риккетсий образцы гемолимфы и суспензий клещей исследованы методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ),

«РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica*/*Rickettsia heilongjiangensis*», «Вектор-Бест», Новосибирск, и при применении ПЦР со специфичными праймерами к гену *gltA* (Igolkina, 2018) с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза.

Результаты. При исследовании гемолимфы методом ПЦР-РВ положительные результаты обнаружения ДНК выявлены в 7 пробах, в суспензиях клещей — в 9 пробах. Частота совпадения результатов равна $81,8 \pm 12,2\%$. Ген *gltA* методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза выявлен во всех 11 пробах гемолимфы, в суспензиях клещей — в 10. Частота совпадения составила $90,9 \pm 9,1\%$, но чувствительность (100%) при исследовании гемолимфы данным методом выше, чем при исследовании суспензий клещей.

Выводы. Для обнаружения ДНК риккетсий достаточно исследовать гемолимфу клещей. Для оптимизации выделения штаммов из переносчиков предлагаем перед проведением биопробы исследовать гемолимфу клещей методом ПЦР и только положительные пробы использовать для заражения.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЕВРОПЕЙСКОГО ЛИССАВИРУСА ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ 1-го ТИПА, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ ЛЕТУЧЕЙ МЫШИ ВИДА *EPTESICUS SEROTINUS*, ПОЙМАННОЙ В ОКРЕСТНОСТЯХ г. ВОРОНЕЖ В КОНЦЕ 2019 г.

А.С. Сперанская^{1,2}, А.Е. Самойлов^{1,5}, В.В. Каптелова¹, И.В. Артюшин², Е.Г. Симонова³, А.А. Шабейкин⁴, А.М. Гулюкин⁴, Т.В. Степанова⁴, В.В. Стаффорд⁴, А.В. Паршикова⁴, В.Г. Дедков⁵

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва;

³ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, Москва;

⁴ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва;

⁵ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Ключевые слова: европейский лиссавирус летучих мышей 1-го типа, секвенирование генома

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-251>

GENOME SEQUENCE OF EUROPEAN BAT 1 LYSSAVIRUS ISOLATED FROM *EPTESICUS SEROTINUS*, WHICH WAS CAUGHT NEAR VORONEZH CITY IN LATE 2019

A.S. Speranskaya^{1,2}, A.E. Samoilov^{1,5}, V.V. Kaptelova¹, I.V. Artyushin², E.G. Simonova³, A.A. Shabeykin⁴, A.M. Gulyukin⁴, T.V. Stepanova⁴, V.V. Stafford⁴, A.V. Parshikova⁴, V.G. Dedkov⁵

¹Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia;

⁴Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre VIEV», Moscow, Russia;

⁵Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Key words: European bat 1 Lyssavirus, genome sequencing

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-251>

Большинство случаев бешенства летучих мышей в Европе связано с европейским лиссавирусом летучей мыши 1 (European bat 1 lyssavirus, EBLV-1). Размер генома этих вирусов составляет чуть менее 12 тыс. п.о. В конце ноября 2019 г. местные жители в окрестностях Воронежа подобрали самку позднего кожана (*Eptesicus serotinus*) с признаками энцефалопатии, в истощённом состоянии. После смерти животного было проведено исследование методом иммунофлуоресценции, установившее диагноз бешенство. Для выявления этиологического агента заболевания ткани мозга были извлечены и помещены в реагент TRIzol™

(700 мкл), ресуспендированы непосредственно в TRIzol, затем к ним добавили 560 мкл этанола и провели очистку, используя QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Двухцепочечную кДНК синтезировали, используя модули NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB), и фрагментировали, применяя Covaris M220. Библиотеки готовили, используя набор Ion Xpress Plus (Thermo Fisher Scientific), а также в совокупности 17 циклов амплификации с помощью полимеразы Q5[®] (NEB) и Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Секвенирование проводили на приборе Ion S5 (Thermo Fisher Scientific), используя 540 чипы (200 п.о.). В результате сборки (проведённой с помощью SPAdes 3.11.1) была получена последовательность нуклеотидов длиной 11903 п.о, которая была гомологична на 95,4–99,4% последовательностям EBLV-1, представленным в GenBank NCBI. Филогенетический анализ показал, что установленная последовательность генома EBLV-1 из Воронежской области ближе всего к вирусам, изолированным в 1985 г. в России (Белгород, 9397RUS, [MF187867.1]), также в 1987 г. в Украине (Волинская область, 9443UKR [MF187876.1]) и в 2017 г. в Германии (13027 [LT839613.1]).



ОЦЕНКА НАЛИЧИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГМО В ПЫЛЬЦЕ, СОБИРАЕМОЙ ПЧЁЛАМИ

К.А. Осянин, А.Р. Макаева, Д.А. Миргазов, И.А. Елизарова

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности», Казань

Ключевые слова: ГМО, ПЦР, ДНК, пыльца, пчёлы

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-253>

EVALUATION OF THE REGULATORY SEQUENCE OF GMOS PRESENCE IN POLLEN COLLECTED BY BEES

K.A. Osyanin, A.R. Makaeva, D.A. Mirgazov, I.A. Elizarova

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for toxicological, radiation,
and biological safety», Kazan, Russia

Key words: GMO, PCR, bees, honey, pollen

DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-9900432-9-9-253>

Введение. В современном мире всё чаще используются генетически модифицированные растения. Это позволяет повышать урожайность, снижать себестоимость продукции, а также выращивать теплолюбивые растения в северных районах с более суровым климатом. В настоящее время степень воздействия ГМ организмов на человека недостаточно изучена. Покупая фермерские продукты, такие как мёд, потребители рассчитывают на полное отсутствие в их составе ГМО.

Цель исследования. Данные исследования направлены на индикацию генетического материала ГМО в пыльце, собираемой пчёлами.

Материалы и методы. Для сбора пыльцы были расставлены улья пчелиные в радиусе ста километров от города Казани Республики Татарстан. Улья были размещены в пяти районах республики (г. Казань, Арский район, Верхнеуслонский район, Пестречинский район, Зеленодольский район). Для анализа собиралась обножка три раза за сезон 2019 года. Микроскопию пыльцевых зерен проводили с использованием светового микроскопа Микмед-6 с цифровой камерой Orlenic. Выделение ДНК из пыльцы проводили с помощью набора «Сорб-ГМО-А» производства ЗАО «Синтол» сорбентным методом, согласно инструкции. Наличие вставок ГМО определяли с использованием наборов «Растение / 35S + FMV / NOS скрининг» того же производителя. Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени осуществляли на амплификаторе C1000 с оптическим блоком CFX96, Biorad. Анализ результатов проводили

с использованием программного обеспечения CFX Manager. Анализировались данные по каналам амплификации ROX, FAM, R6G.

Результаты. Было проанализировано 15 проб пыльцы в трёх повторностях. Пыльцевой состав по результатам микроскопии был полифлёрный. Присутствовали пыльцевые зёрна различных растений. При проведении молекулярно-генетического анализа во всех образцах ДНК при проведении ПЦР отмечалось накопление флуоресценции по каналу контроля наличия ДНК растений. В пробах пыльцы, отобранных в районах Арский, Верхнеуслонский, Пестречинский, Зеленодольский, не обнаруживалось наличие регуляторных последовательностей 35S CaMV, 35S FMV и терминатора NOS. В пробе пыльцы, полученной в г. Казани, были обнаружены целевые участки ДНК ГМО. Накопление флуоресценции по каналам ROX и FAM преодолело пороговые значения на 23 и 27 циклах амплификации соответственно.

Выводы. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что мёд, полученный в пределах города, может содержать последовательности ГМ растений из-за возможного выращивания модифицированных растений частными садоводами, пыльцу которых будут собирать пчёлы. Данное исследование в дальнейшем будет расширено и по возможности охватит всю территорию Республики Татарстан.