Том 13, № 1. С. 1–200
2023
ISSN 2220-7619 (print)
ISSN 2313-7398 (online)

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Данный выпуск реализован при финансовой поддержке Правительства Санкт-Петербурга

Иллюстрация к статье «Коллективный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Республики Армения» (авторы: А.Ю. Попова, В.С. Смирнов, С.А. Егорова, А.В. Ванян, А.М. Миличкина, Н.Г. Бакунц, И.В. Дрозд, Р.А. Абовян, В.А. Иванов, Г.Г. Мелик-Андреасян, Э.С. Рэмзи, Г.О. Палозян, Т.В. Арбузова, А.С. Кешишян, О.Б. Жимбаева, О.А. Петрова, А.В. Губанова, А.П. Разумовская, А.А. Тотолян) (с. 75–90)
Illustration for the article "SARS-CoV-2 collective immunity among the population of the Republic of Armenia" (authors: Popova A.Yu., Smirnov V.S., Egorova S.A., Vanyan A.V., Milichkina A.M., Bakunts N.G., Drozd I.V., Abovyan R.A., Ivanov V.A., Melik-Andreasyan G.G., Ramsay E.S., Palozyan G.H., Arbuzova T.V., Keshishyan A.S., Zhimbayeva O.B., Petrova O.A., Gubanova A.V., Razumovskaya A.P., Totolian A.A.) (pp. 75–90)

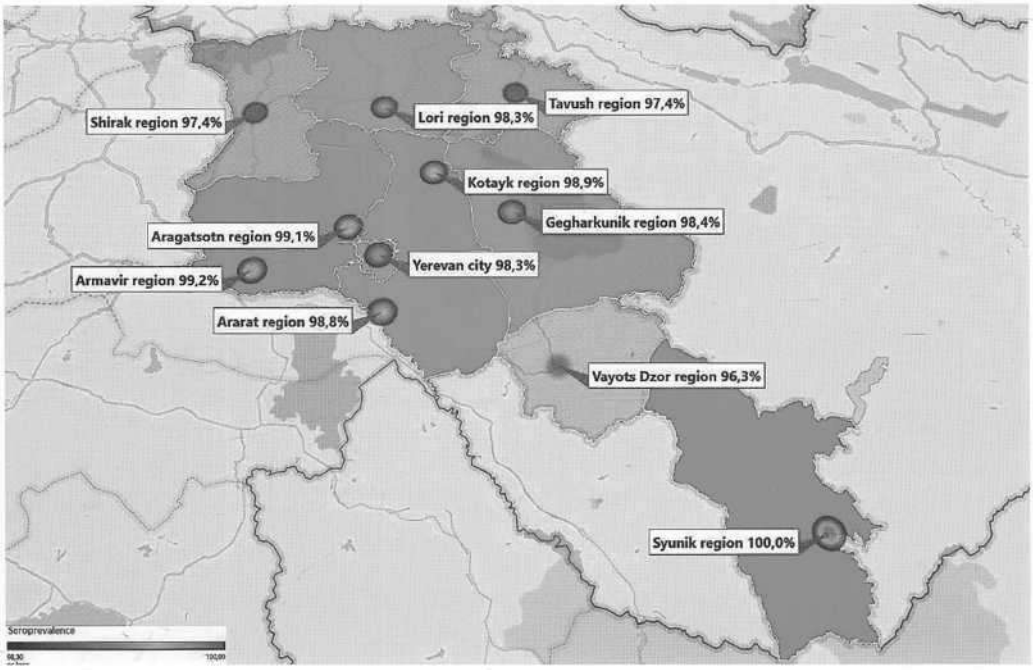


Figure 18. Heat map of the regional distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence
Note. White boxes indicate seroprevalence levels (%). The color intensities of regions correspond to the percentage of seropositive individuals. The scale is shown in the lower left corner.

СЕВЕРО-ЗАПАДНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ (СПб РО РААКИ)

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

январь–февраль
2023, том 13 **№ 1**

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

ADTI
AXB.-RESURS MARKAZI
INV № 1493

Редакционный совет

Алешкин В.А. д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Бухарин О.В. д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия

Вишневский Б.И. д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Долгушин И.И. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия

Зверев В.В. д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Кафтырева Л.А. д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Кашкин К.П. д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия

Кубарь О.И. д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Малеев В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия

Нарвская О.В. д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Савичева А.М. д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Тец В.В. д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Харит С.М. д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Чекнев С.Б. д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия

Шкарин В.В. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Типография ООО «Аллегро»
196084, Санкт-Петербург,
ул. Коли Томчака, 28.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 24.02.2023 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1044

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2023
© НИИЭМ имени Пастера, 2023
© СПб РО РААКИ, 2023

NORTH-WEST REGIONAL BRANCH OF MEDICAL SCIENCES
SAINT PETERSBURG PASTEUR INSTITUTE
RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH (SPb RAACI)

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

January–February

2023, volume 13 **No. 1**

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

Alexander S. Apt — DSc (Biology), Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation

Luis Barbeito — MD, PhD, Professor, Institut Pasteur de Montevideo, Head of the Laboratory of Neurodeneration, Montevideo, Uruguay

Paul Brey — PhD, Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos

Alexander L. Gintsburg — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation

Irina N. Lavrentieva — DSc (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation

Yuri V. Lobzin — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Scientiic Director, St. Petersburg, Russian Federation

Hechmi Louzir — Professor, Institut Pasteur de Tunis, President, Tunis, Tunisia

Dmitry K. Lvov — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ken Maeda — PhD, DVM, Professor, National Institute of Infectious Diseases, Director, Tokio, Japan

Nikolai V. Medunitsyn — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation

Michael I. Michailov — DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Microbiology and Virology, Moscow, Russian Federation

Hristo Najdenski — PhD, Professor, Institute Stephan Angeloff; Head of the Department of Infectious Microbiology, Sofia, Bulgaria

Gennadiy G. Onishchenko — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Deputy President of the Russian Academy of Education, Moscow, Russian Federation

Vadim V. Pokrovskiy — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation

Angela Santoni — PhD, Professor, Institut Pasteur in Italy — Cenci Bolognetti Foundation, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

Andrei S. Simbirtsev — DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Artem A. Totolian — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Irina S. Freidlin — DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Valery A. Chereshnev — DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation

Andre Spiegel — MD, PhD, Professor, Institut Pasteur du Cambodge, Director, Phnom Penh, Cambodia

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin DSc (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Oleg V. Bukharin DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation

Boris I. Vishnevsky DSc (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation

Ilja I. Dolgushin DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation

Vitaly V. Zverev DSc (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Scientific Director, Moscow, Russian Federation; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Lidiia A. Kaftyreva DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation

Kirill P. Kashkin DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation

Olga I. Kubar DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Victor V. Maleev DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation

Olga V. Narvskaya DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation

Alevtina M. Savicheva DSc (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Sergei A. Selkov DSc (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Viktor V. Tets DSc (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation

Susanna M. Kharit DSc (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

Sergei B. Cheknev DSc (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation

Vyacheslav V. Shkarin DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Assistant editor: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)
Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)
Copy editor: Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)
Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

Founders
North-West Regional Branch of Medical Sciences
Saint Petersburg Pasteur Institute
Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region
Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010
Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media
Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

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

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

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

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

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

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

Editorial Office
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Ten.: (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House
196084, Russian Federation, St. Petersburg, Koli Tomchaka str., 28.
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 24.02.2023. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2023
© St. Petersburg Pasteur Institute, 2023
© SPb RAACI, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Нестерова И.В., Атажахова М.Г., Тетерин Ю.В., Матушкина В.А., Чудилова Г.А., Митропанова М.Н.

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ (NETs) В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ТЯЖЕЛОГО COVID-19: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ И АКТИВНОСТЬ NETs 9

Кубарь О.И., Микиртичан Г.Л.

ЧЕТВЕРТЫЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОММЕНТАРИЙ К COVID-19 (три года спустя). ДОВЕРИЕ И ВЕРА: СОЦИАЛЬНО-НРАВСТВЕННЫЙ СРЕЗ ВАКЦИНАЦИИ 29

Оригинальные статьи

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

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В 2020–2022 гг., В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК МЫШЕЙ 37

Инвияева Е.В., Косолапова Ю.А., Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Макиева М.И., Зубков В.В.

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ У МАТЕРЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 НА РАЗНЫХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ 46

Топтыгина А.П., Афридонова З.Э., Закиров Р.Ш., Семикина Е.Л.

ПОДДЕРЖАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ 55

Кудряшова А.М., Мануйлов В.А., Мурзина А.А., Каира А.Н., Борисова О.В.

ДИНАМИКА МАТУРАЦИИ АВИДНОСТИ IgG-АНТИТЕЛ К RBD SARS-CoV-2 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКА И ТИПА ИММУНИЗАЦИИ 67

Попова А.Ю., Смирнов В.С., Егорова С.А., Ванян А.В., Миличкина А.М., Бакунц Н.Г., Дрозд И.В., Абовян Р.А., Иванов В.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Рэмзи Э.С., Палозян Г.О., Арбузова Т.В., Кешишян А.С., Жимбаева О.Б., Петрова О.А., Губанова А.В., Разумовская А.П., Тотолян А.А.

КОЛЛЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ К SARS-CoV-2 НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ 75

Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Бадлеева М.В., Герасимова А.А., Белопольская О.Б., Машарский А.Э., Костюкова И.В., Жданова С.Н., Мударисова Р.С., Авадэний И., Соловьева Н.С., Найзабаева Д.А., Скиба Ю.А., Журавлев В.Ю., Пасечник О.А., Огарков О.Б.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ГИПЕРВИРУЛЕНТНОГО СУБТИПА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING 14717-15 91

Штрек С.В., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Санников А.В., Самойленко И.Е., Щучинова Л.Д., Троценко О.Е., Драгомерецкая А.Г., Матущенко Е.В.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РИККЕТСИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ И ХАБАРОВСКОГО КРАЯ 100

Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Федорченко Т.Г., Липунова Г.Н., Тунгусов В.Н., Чупахин О.Н.

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ВЕРДАЗИЛОВ И ЛЕЙКОВЕРДАЗИЛОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ ГРУППЫ В 107

Обейд Х.М., Сале С.С., Бунденга Л.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) СОЕДИНЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* И *GIARDIA LAMBLIA* 119

Нгуен Т.Б., Нгуен Т.Н.Т., Данг Т.Х., Нгуен Б.Н., Чыонг Т.М.Х., Ле Т.Х., Ле Н.Д.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С СЕПСИСОМ ВО ВЬЕТНАМСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОЙ ДЕТСКОЙ БОЛЬНИЦЕ (СЕВЕРНЫЙ ВЬЕТНАМ) 127

Ратридеви И., Амалия Х., Хувеа Т.Э.К.Ю., Путера М.Э., Сулистихоно Э.
СИСТЕМНЫЙ КАНДИДОЗНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ТЕСТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШКАЛЫ CANDIDA SCORE И ПОДСЧЕТОМ МОНОЦИТОВ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ПОЗДНИМ СЕПСИСОМ: ИССЛЕДОВАНИЕ В СТРАНЕ С ОГРАНИЧЕННЫМИ РЕСУРСАМИ 133

Османи Ф.
ПРОГНОЗНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИ ДЕРЕВА РЕШЕНИЙ 141

Салех Р.О., Махмуд Л.А., Мохаммед М.А., Аль-Рави Х.Ф., Аль-Хакейм Х.К.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЯДА ЦИТОКИНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КОСТНОЙ ТКАНЬЮ, В КАЧЕСТВЕ ПРЕДИКТОРОВ ТЯЖЕСТИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА ПРИ ПОМОЩИ НЕЙРОСЕТЕВОГО АНАЛИЗА 147

Краткие сообщения

Брюхачева Е.О., Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Пьянзова Т.В.
ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ У ДЕТЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНУЮ ТЕРАПИЮ 156

Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадтиев А.К., Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г.
ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ В УСЛОВИЯХ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КРЫС 161

Кондратенко О.В., Лямин А.В., Ерещенко А.А., Антипов В.А.
ОПЫТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЖИДКОСТИ НАЗАЛЬНОГО ЛАВАЖА ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТА С МУКОВИСЦИДОЗОМ 167

Витиэлло А., Фэррара Ф.
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ SARS-CoV-2 И РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ: КРАТКИЙ ОБЗОР ПОСЛЕДНИХ ДАННЫХ 171

В помощь практическому врачу

Самойлов К.В., Ермолаева Ю.А., Пономарева Д.А., Худякова А.А., Проценко А.В.
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 У РЕБЕНКА НА ФОНЕ МОРБИДНОГО ОЖИРЕНИЯ 174

Воробьева О.В., Гималдинова Н.Е., Романова Л.П.
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ИНФИЦИРОВАНИЯ SARS-CoV-2, ОСЛОЖНЕННОГО НЕФРОГЕННЫМ ОТЕКОМ ЛЕГКИХ И COVID-АССОЦИИРОВАННЫМ ПНЕВМОНИТОМ, АЛЬВЕОЛИТОМ 183

Методы

Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Мельникова Е.В.
МЕТОД СЕЛЕКТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ *ACINETOBACTER BAYLYI* ИЗ РЕЧНОЙ ВОДЫ 191

Правила для авторов 197

Авторский указатель 200

Предметный указатель 200

CONTENTS

Reviews

Nesterova I.V., Atazhakhova M.G., Teterin Yu.V., Matushkina V.A., Chudilova G.A., Mitropanova M.N.
THE ROLE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETs) IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF SEVERE COVID-19: POTENTIAL IMMUNOTHERAPEUTIC STRATEGIES REGULATING NET FORMATION AND ACTIVITY 9

Kubar O.I., Mikirtichan G.L.
THE FOURTH ETHICAL COMMENT TOWARDS COVID-19 (three years later). TRUST AND FAITH: SOCIAL AND MORAL PROFILE OF VACCINATION 29

Original articles

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V.
INVESTIGATING ANTIGENIC FEATURES OF THE SARS-CoV-2 ISOLATED IN RUSSIAN FEDERATION IN 2021–2022 BY HYPERIMMUNE MOUSE SERUM NEUTRALISATION 37

Inviyaeva E.V., Kosolapova Yu.A., Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Makieva M.I., Zubkov V.V.
FEATURES OF LYMPHOCYTE SUBSET COMPOSITION IN NEONATES BORN TO MOTHERS SUFFERED FROM COVID-19 AT DIFFERENT STAGES OF PREGNANCY 46

Toptygina A.P., Afridonova Z.E., Zakirov R.Sh., Semikina E.L.
MAINTAINING IMMUNOLOGICAL MEMORY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS DURING COVID-19 PANDEMIC 55

Kudryashova A.M., Manuylov V.A., Murzina A.A., Kaira A.N., Borisova O.V.
DYNAMICS IN MATURATION OF SARS-CoV-2 RBD-SPECIFIC IgG ANTIBODY AVIDITY DEPENDING ON IMMUNIZATION TIMEFRAME AND TYPE 67

Popova A.Yu., Smirnov V.S., Egorova S.A., Vanyan A.V., Milichkina A.M., Bakunts N.G., Drozd I.V., Abovyan R.A., Ivanov V.A., Melik-Andreasyan G.G., Ramsay E.S., Palozyan G.H., Arbuzova T.V., Keshishyan A.S., Zhimbayeva O.B., Petrova O.A., Gubanova A.V., Razumovskaya A.P., Totolian A.A.
SARS-CoV-2 COLLECTIVE IMMUNITY AMONG THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF ARMENIA 75

Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., Badleeva M.V., Gerasimova A.A., Belopolskaya O.B., Masharsky A.E., Kostyukova I.V., Zhdanova S.N., Mudarisova R.S., Avadenii I., Solovieva N.S., Naizabayeva D.A., Skiba Yu.A., Zhuravlev V.Yu., Pasechnik O.A., Ogarkov O.B.
MOLECULAR DETECTION AND PHYLOGEOGRAPHY OF THE HYPERVIRULENT SUBTYPE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING 14717-15 91

Shtrek S.V., Rudakov N.V., Shpynov S.N., Sannikov A.V., Samoylenko I.E., Shchuchinova L.D., Trotsenko O.E., Dragomeretskaya A.G., Matushchenko E.V.
GENOTYPING OF RICKETTSIAS CIRCULATING IN THE TERRITORIES OF THE ALTAI REPUBLIC AND KHABAROVSK KRAI 101

Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Tungusov V.N., Chupakhin O.N.
ANTIVIRAL PROPERTIES OF VERDAZYLS AND LEUCOVERDAZYLS AND THEIR ACTIVITY AGAINST GROUP B ENTEROVIRUSES 107

Obaid H.M., Sale S.S., Boundenga L.
PHARMACEUTICAL ACTIVITY OF A SYNTHETIC HETEROCYCLIC ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) COMPOUND ON *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* AND *GIARDIA LAMBLIA* 119

Nguyen T.B., Nguyen T.N.T., Dang T.H., Nguyen B.N., Truong T.M.H., Le T.H., Le N.D.
CLINICAL CHARACTERISTICS AND LABORATORY TEST IN FULL-TERM NEONATES WITH SEPSIS IN VIETNAM NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL (NORTHERN VIETNAM) 127

Ratridewi I., Amalia K., Huwae T.E.C.J., Putera M.A., Sulistijono E.
SYSTEMIC CANDIDOSIS DIAGNOSTIC TEST WITH CANDIDA SCORE AND MONOCYTE COUNT IN PREMATURE INFANTS WITH LATE-ONSET SEPSIS: RESEARCH IN LOW RESOURCES COUNTRY 133

Osmani F.
A PREDICTIVE PERFORMANCE ANALYSIS OF VITAMIN D DEFICIENCY USING A DECISION TREE MODEL 141

Saleh R.O., Mahmood L.A., Mohammed M.A., Al-Rawi K.F., Al-Hakeim H.K.
USE OF SOME BONE-RELATED CYTOKINES AS PREDICTORS FOR RHEUMATOID ARTHRITIS SEVERITY BY NEURAL NETWORK ANALYSIS 147

Short communications

Bryukhacheva E.O., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Pyanzova T.V.
CHARACTERISTICS OF THE INTESTINAL MICROFLORA IN CHILDREN RECEIVING ANTI-TUBERCULOSIS THERAPY 156

Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G.
THE FEATURES OF DEVELOPING RAT AUTOIMMUNE PATHOLOGY WITH MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION 161

Kondratenko O.V., Lyamin A.V., Ereshchenko A.A., Antipov V.A.
MICROBIOLOGICAL MONITORING OF NASAL LAVAGE FLUID AS A METHOD FOR EARLY DETECTION AND PREVENTION OF BACTERIAL LUNG COMPLICATIONS IN A PATIENT WITH CYSTIC FIBROSIS 167

Vitiello A., Ferrara F.
RAS AND SARS-CoV-2 INTERACTION: SHORT REVIEW OF THE LATEST EVIDENCE 171

For the practical physicians

Samoylov K.V., Ermolaeva Yu.A., Ponomareva D.A., Khudyakova A.A., Protsenko A.V.
CLINICAL CASE OF SEVERE COVID-19 IN A CHILD WITH MORBID OBESITY 174

Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.
A CLINICAL CASE OF SARS-CoV-2 INFECTION COMPLICATED BY NEPHROGENIC PULMONARY EDEMA AND COVID-ASSOCIATED PNEUMONITIS, ALVEOLITIS 183

Methods

Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Melnikova E.V.
METHOD OF SELECTIVE ISOLATION OF *ACINETOBACTER BAYLYI* FROM RIVER WATER 191

Instructions to Authors 197

Author index 200

Subject index 200

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 9–28

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 9–28

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ (NETs) В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ТЯЖЕЛОГО COVID-19: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ И АКТИВНОСТЬ NETs

И.В. Нестерова[1,2], М.Г. Атажахова[1], Ю.В. Тетерин[1], В.А. Матушкина[1], Г.А. Чудилова[1], М.Н. Митропанова[1]

[1] ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, Россия
[2] ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Резюме. Роль нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в патогенезе COVID-19 связана с рекрутированием НГ в очаги воспаления, активацией их функций и усиленным образованием нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NETs). В данном обзоре нами проанализирован достаточно большой объем научной литературы, посвященной особенностям формирования NETs, их роли в патогенезе COVID-19, участию в возникновении иммунотромбозов, васкулита, острого респираторного дистресс-синдрома, синдрома цитокинового шторма, мультиорганных поражений. Приведены убедительные данные, четко указывающие на значительное участие NETs в иммунопатогенезе COVID-19 и связанными с ними тяжелыми осложнениями, возникающими в результате усиления процесса воспаления, который является ключевым для течения инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Представленная роль НГ и NETs, наряду с ролью других клеток иммунной системы и провоспалительных цитокинов, чрезвычайно важна в понимании развития гиперактивного иммунного ответа при тяжелой форме COVID-19. Полученные научные результаты, доступные на сегодняшний день, позволяют идентифицировать возможности регуляторных воздействий на гиперактивированные НГ, на процессы формирования NETs на различных этапах и на ограничение негативного воздействия уже сформированных NETs на различные ткани и органы. Все вышеперечисленное должно помочь в создании новых, специализированных иммунотерапевтических стратегий, предназначенных для увеличения шансов на выживание, уменьшения тяжести клинических проявлений у пациентов с COVID-19, а также в значительном снижении

Адрес для переписки:
Нестерова Ирина Вадимовна
350063, Российская Федерация, г. Краснодар,
ул. им. Митрофана Седина, 4, Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России.
Тел.: 8 916 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Contacts:
Irina V. Nesterova
350063, Russian Federation, Krasnodar, Mitrofan Sedin str., 4,
Kuban State Medical University, Ministry of Health of Russia.
Phone: +7 916 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Для цитирования:
Нестерова И.В., Атажахова М.Г., Тетерин Ю.В., Матушкина В.А., Чудилова Г.А., Митропанова М.Н. Роль нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NETs) в иммунопатогенезе тяжелого COVID-19: потенциальные иммунотерапевтические стратегии, регулирующие процесс формирования и активность NETs // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 9–28. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-2058

Citation:
Nesterova I.V., Atazhakhova M.G., Teterin Yu.V., Matushkina V.A., Chudilova G.A., Mitropanova M.N. The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in the immunopathogenesis of severe COVID-19: potential immunotherapeutic strategies regulating net formation and activity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 9–28. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-2058

© Нестерова И.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TRO-2058

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

показателей смертности. В настоящее время возможно применение уже существующих лекарственных препаратов, и разрабатывается целый ряд новых лекарственных средств, действие которых может регулировать количество НГ, позитивно влиять на функции НГ и ограничивать интенсивность формирования NETs. Продолжение исследований роли гиперактивированных НГ и нетоза, а также понимание механизмов регуляции феномена образования и ограничения активности NETs при тяжелом COVID-19, по-видимому, являются приоритетными, поскольку в дальнейшем полученные новые данные могли бы стать основой в разработке таргетных подходов не только к иммунотерапии, направленной на ограничение образования и блокирование негативных воздействий уже сформировавшихся NETs при тяжелом COVID-19, но и к иммунотерапии, которую можно было бы использовать в комплексном лечении других нетопатий, в первую очередь, аутоиммунных болезней, аутовоспалительных синдромов, тяжелых гнойно-воспалительных процессов, в том числе бактериального сепсиса и гематогенного остеомиелита.

Ключевые слова: *COVID-19, SARS-CoV-2, нейтрофильные гранулоциты, нейтрофильные экстрацеллюлярные сети, NETs, нетопатии, ARDS, иммунотромбоз.*

THE ROLE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETs) IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF SEVERE COVID-19: POTENTIAL IMMUNOTHERAPEUTIC STRATEGIES REGULATING NET FORMATION AND ACTIVITY

Nesterova I.V.[a,b], Atazhakhova M.G.[a], Teterin Yu.V.[a], Matushkina V.A.[a], Chudilova G.A.[a], Mitropanova M.N.[a]

[a] Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation
[b] Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. The role of neutrophil granulocytes (NG) in the pathogenesis of COVID-19 is associated with the NG recruitment into inflammatory foci, activation of their functions and enhanced formation of neutrophil extracellular networks (NETs). In this review, we analyzed a large body of scientific literature devoted to the features of developing NETs, their role in the COVID-19 pathogenesis, a role in emerging immunothrombosis, vasculitis, acute respiratory distress syndrome, cytokine storm syndrome, and multi-organ lesions. Convincing data are presented clearly indicating about a profound role of NETs in the COVID-19 immunopathogenesis and associated severe complications resulting from intensified inflammation process, which is a key for the course of SARS-CoV-2 virus infection. The presented role of NGs and NETs, along with that of other immune system cells and pro-inflammatory cytokines, is extremely important in understanding development of overactive immune response in severe COVID-19. The scientific results obtained available now allow to identify an opportunity of regulatory effects on hyperactivated NGs, NETosis at various stages and on limiting a negative impact of pre-formed NETs on various tissues and organs. All the aforementioned data should help in creating new, specialized immunotherapy strategies designed to increase the odds of survival, reduce severity of clinical manifestations in COVID-19 patients as well as markedly reduce mortality rates. Currently, it is possible to use existing drugs, while a number of new drugs are being developed, the action of which can regulate NG quantity, positively affect NG functions and limit intensity of NETosis. Continuing research on the role of hyperactive NG and NETosis as well as understanding the mechanisms of regulating NET formation and restriction in severe COVID-19, apparently, are of high priority, because in the future the new data obtained could pave the basis for development of targeted approaches not only for immunotherapy aimed at limiting education and blocking negative effects already formed NETs in severe COVID-19, but also for immunotherapy, which could be used in combination treatment of other netopathies, primarily autoimmune diseases, auto-inflammatory syndromes, severe purulent-inflammatory processes, including bacterial sepsis and hematogenous osteomyelitis.

Key words: *COVID-19, SARS-CoV-2, neutrophil granulocytes, neutrophil extracellular traps, NETs, netopathies, ARDS, immunothrombosis.*

Введение

На сегодняшний день накоплен довольно большой объем информации об особенностях строения, работы и функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Известно, что они относятся к наиболее многочисленной популяции циркулирующих в крови лейкоцитов (~57%), являются клетками иммунной системы, которые формируют первую линию защиты [140], обладают мощным микробицидным и регуляторным потенциалом [9], способны осуществлять килинг различных патогенов (бактерий, вирусов, грибов, одноклеточных) в локусах воспаления, используя различные интрацеллюлярные и экстрацеллюлярные механизмы [48]. До недавнего времени в научных кругах считалось, что основным способом

борьбы НГ с патогенами является фагоцитоз и способность к высвобождению содержимого своих гранул — дегрануляция, но на рубеже 2004–2005 гг. внимание биологов и врачей было приковано к совершенно новому явлению, которое значительно расширило наше представление о роли этих клеток в организме человека и животных. В институте инфекционной биологии им. Макса Планка в Берлине под руководством Arturo Zychlinsky было обнаружено, что НГ при контакте с патогенами образуют внеклеточные сетеподобные структуры, содержащие ДНК и содержимое гранул: ферментные и неферментные белки и т. д. [6]. Так был открыт нетоз и показана ранее никем не описанная способность НГ к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек NETs (neutrophil extracellular traps) как способу борьбы НГ с различными патогенами. Описаны также две его разновидности: суицидальный нетоз, при котором, образуя экстрацеллюлярные сети, НГ разрушаются и погибают, и витальный нетоз — нелитическое высвобождение NETs из митохондрий в мембранных везикулах с сохранением целостности клеток [35]. NETs — это иммуногенные [82] и токсичные [118] сети ДНК, которые образуются вследствие деконденсации хроматина ядер НГ. В своем составе они имеют гистоны и различные белки, например, эластазу, миелопероксидазу, кателицидины, кальпротектин, α-дефенсины и белки цитоскелета [38, 141]. В естественных условиях *(in vivo)* стимулом для образования NETs могут служить патогены, индуцирующие нетоз напрямую, компоненты бактерий, активированные тромбоциты, аутоантитела, перекись водорода, IL-8, кристаллы уратов, а также молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью (DAMP) [35]. При этом определенную роль играет размер патогена: к примеру, гифы грибов потенцируют НГ на образование NETs, а мелкие бактерии утилизируются путем фагоцитоза. В то же время кокковые и биопленкообразующие бактерии *(Staphilococcus aureus)* могут стимулировать образование NETs [35].

Механизмы образования NETs

В зависимости от стимула, образование NETs происходит разными сигнальными путями и может быть опосредованно через рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), а также через хемокиновые и цитокиновые рецепторы, Toll-подобные рецепторы и Fc-рецепторы (FcR) [35]. Сигнал передается внутрь клетки, что приводит к выходу из эндоплазматического ретикулума ионов кальция Ca^{2+} и активации NADPH-оксидазы (NOX). Активность последней приводит к образованию реактивных форм кислорода (ROS — Reactive oxygen species). Однако в экспериментальных работах *(in vitro)* было показано, что ROS, помимо NOX, имеют митохондриальное происхождение и играют ключевую роль в дальнейшем образовании NETs [142]. ROS действуют на азурофильные гранулы с последующим высвобождением в цитозоль клетки нейтрофильной эластазы (NE) и миелопероксидазы (MPO). В цитоплазме NE разрушает актин, мембрану ядра НГ и вместе с MPO проникает в ядро. Под действием ROS также активируется фермент пептидил-аргининдеиминаза 4 (Peptidylarginine deiminase 4 — PAD4), который вызывает цитруллинирование гистонов нейтрофильной ДНК. Действие на хроматин NE, MPO и цитруллинирование гистонов приводит к деконденсации хроматина ядра. В дальнейшем происходит разрушение ядерной мембраны НГ с выходом деконденсированного хроматина в цитозоль клетки, где с ним связываются цитоплазматические белки и ферменты. Образование NETs завершается разрывом цитоплазматической мембраны НГ под действием гасдермина D и выходом хроматина за пределы клетки [110]. Гистоны MPO, NE и катепсин G в составе NETs обладают выраженным микробицидным действием, уничтожая внеклеточно расположенные микроорганизмы, но при этом они, при определенных условиях, могут являться первичными компонентами деструкции тканей, негативно влиять на физиологическую функцию клеток, в том числе эндотелиальных (ЭК), вызывая воспаление [29]. Недавние исследования показали, что НГ могут иметь неизвестный ранее иммунный механизм в борьбе с инфекционными патогенами, сходный с механизмом клеточной памяти. При повторном контакте с одним и тем же патогеном этот механизм клеточной памяти индуцирует адаптивный ответ наивных НГ [38, 82, 118, 141]: при повторной стимуляции НГ могут рекрутироваться и активироваться, что вызывает более выраженный иммунный ответ. Наряду с этим было показано, что этот процесс может зависеть от концентрации микроорганизмов [82, 141]. Так, низкие дозы микроорганизмов, полученных из микробиоты, вызывают адаптивный ответ НГ, в то время как высокие дозы этих же микроорганизмов могут его ингибировать [141]. Предполагается, что NETs способны улавливать и облегчать элиминацию бактерий, грибов, простейших и даже вирусов [59, 71, 99, 116, 141], но не всегда нетоз может иметь благоприятные последствия.

За последнее время накоплен довольно большой объем клинического материала и экспериментальных работ, которые все больше доказывают негативное влияние гиперактивированных НГ, легко формирующих NETs,

на организм человека и связано это с тем, что NETs индуцирует развитие многих патологических процессов, в том числе и при вирусных инфекциях [117]. Нарушение процессов нетоза на фоне нейтрофилеза и гиперактивации НГ, сопровождающееся повышенным образованием NETs, может вызвать повреждение эпителия, а также эндотелия сосудов, ведущее к возникновению эндотелиальной дисфункции (ЭД), индуцировать неконтролируемую воспалительную реакцию и прогрессирование различных иммунозависимых патологических процессов, что приводит к возникновению замкнутого порочного круга и является фактором риска развития острых или обострения хронических сердечно-сосудистых, инфекционно-воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний. При этом следует отметить, что именно изучение иммунопатогенеза некоторых аутоиммунных заболеваний в течение последнего десятилетия, предопределило возникновение нового термина — нетопатии, подчеркивая ведущую негативную роль усиленного формирования NETs при этих иммунозависимых патологических процессах.

В связи с изложенным полагаем, что имеющиеся на сегодняшний день научные и клинические данные диктуют насущную необходимость разработки и внедрения новых диагностических приемов, поиска различных ассоциированных с NETопатиями терапевтических мишеней, а также создания различных вариантов таргетных иммунотерапевтических подходов, действие которых будут направлены на лечение заболеваний, связанных с нетопатиями [153].

Роль NETs при COVID-19

Роль НГ в патогенезе коронавирусной инфекции довольно велика и связана, прежде всего, с рекрутированием НГ в очаги воспаления, активацией их функций и усиленным образованием NETs по вышеописанному механизму.

Неотъемлемым условием для проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку мишень является наличие на последней рецепторов к ангиотензинпревращающему ферменту 2 (angiotensin converting enzyme 2 — ACE2) [73]. Рецепторы к ACE2 экспрессируют многие клетки организма, включая эпителиоциты II типа легких, клетки проксимальных канальцев почек, энтероциты кишечника, эндотелиоциты сосудов, некоторые иммунные клетки и клетки поджелудочной железы [17]. Именно с таким широким распространением данных рецепторов в организме связан системный эффект COVID-19 [23]. Показано, что при коронавирусной инфекции (COVID-19), протекающей в тяжелой форме, данные системы органов поражаются наиболее часто, и связано это с развитием иммунотромбозов и коагулопатий, опосредованных через процессы нетоза [73, 107]. При проникновении вируса SARS-CoV-2 в клетки мишени последние высвобождают паракринные факторы, которые влияют на соседние эпителиальные клетки, пневмоциты, привлекают в место вторжения НГ и другие иммунные клетки. Образующиеся NETs способны уничтожать эпителиальные и эндотелиальные клетки, а входящие в их состав гистоны обладают цитотоксической активностью и нарушают целостность мембран [11, 149]. Это приводит в итоге к повреждению альвеолярных капилляров, их микротромбозу, появлению экссудата в просвете альвеол, отложению фибрина, кровотечениям, инфильтрации иммунными клетками и неоваскуляризации легочной ткани [12, 29, 31, 154]. Было показано, что содержание таких компонентов NETs, как миелопероксидаза (MPO) и цитруллинированные гистоны, увеличивается при остром респираторном дистресс-синдроме (acute respiratory distress syndrome — ARDS), что может быть использовано для прогноза течения заболевания. Тяжесть заболевания коррелирует с нейтрофилией, что подтверждает прямой вклад НГ в развитие патологии [148]. Циркулирующие компоненты NETs, имеющие в своем составе MPO, могут вызывать микротромбоз сосудов в других органах, а катионные компоненты в их составе, такие как гистоны, могут связываться с отрицательно заряженными мембранами клеток, вызывая их перфорацию и, как следствие, лизис клеток с инициированием воспалительной реакции [47, 125].

NETs содержат в своем составе катионные белки (гистоны, MPO, кателицидины, дефенсины), которые способны оказывать цитопатический эффект на эндотелиоциты сосудов и альвеолоциты легких [85]. К примеру, гистоны способны связываться с отрицательно заряженными мембранами клеток, вызывая повреждение последних с запуском воспаления [85]. По этой причине применение в терапии COVID-19 антигистоновых антител и антител против нейтрофильной эластазы, приводит к снижению повреждение тканей [152].

Проведенные на экспериментальных мышах исследования показали, что NETs и входящие в их состав катионные белки способны активировать макрофаги и другие иммунокомпетентные клетки через TLR с последующей стимуляцией высвобождения TNFα и IL-6 [81]. Также известно, что неконтролируемая активация НГ под действием PAMP и DAMP может привести к сильной активации макрофагов с высвобождением большого количества провоспалительных цитокинов [18].

Обусловленная избыточным образованием NETs деструкция тканей может приводить к усилению SARS-CoV-2-индуцированного цитокинового шторма (ЦШ) и синдрому активации макрофагов (САМ) у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [19].

Кроме того, связываясь с рецепторами ACE-2, SARS-CoV-2 может их блокировать и приводить к повышению концентрации ангиотензина-2 в крови, обусловливая этим его негативный эффект, одновременно снижая концентрацию защитного ангиотензина 1–7 и ангиотензина 1–9 типа.

Было также отмечено, что применение в терапии COVID-19 кислородной терапии высокого давления влечет за собой обострение воспалительного процесса в легких, что связано с интенсификацией образования NETs [53].

Пневмонии, сопровождающиеся усиленным образованием NETs в легких при COVID-19, впоследствии могут приводить к развитию таких респираторных заболеваний, как бронхиальная астма (БА), муковисцидоз (МВ) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [139]. Интенсивность образования NETs в организме коррелирует с тяжестью протекания воспалительного процесса и является прогностическим фактором в развитии новой коронавирусной инфекции [72]. Такие компоненты NETs, как MPO, NE, цитруллинированные гистоны, могут попадать в циркуляторное русло, где их концентрация хорошо коррелирует с тяжестью протекания COVID-19 [156].

В ряде научных работ предполагается, что усиленное образование NETs при COVID-19 может являться причиной развития венозных и артериальных тромбоэмболий [22]. Экспериментально было подтверждено, что образование NETs в циркуляторном русле приводит к развитию венозных тромбозов у мышей [158]. Легкое течение COVID-19 сопровождается развитием физиологического иммунотромбоза, который контролируется системой гемостаза и не имеет широкого распространения в организме. У пациентов с тяжелым течением инфекционного процесса происходит срыв контроля противосвертывающей системы, что приводит к развитию неконтролируемого тромбообразования [44]. Кроме того патологическое тромбообразование приводит, в первую очередь, к повреждению микроциркуляторного русла легких и почек, что сопровождается развитием тяжелой пневмонии и острым повреждением почек [20, 32]. Развивающиеся коагулопатии у детей младенческого возраста при легком течение COVID-19 могут повлечь за собой развитие синдрома Кавасаки [16].

Развитие иммунотромбозов и коагулопатий связано с несколькими причинами, к которым относятся взаимодействие NETs с фосфолипидами мембран тромбоцитов, что активирует плазменную калликреин-кининовую систему с последующим запуском процесса тромбообразования [100]. В основе механизма тромбообразования лежит иммуноопосредованная активация тромбоцитов через P-селектин и образование фибрина, что приводит к агрегации тромбоцитов и образованию тромбов [134]. Гистоны, входящие в состав NETs и находящиеся в свободном состоянии в циркуляторном русле, способны активировать тромбоциты через TLR [106].

Входящие в состав NETs катионные белки, ферменты и оксидные радикалы могут запускать плазменный гемостаз по внешнему пути [97]; высвобождаемый при этом тканевой фактор при повреждении клеток запускает работу системы гемостаза по внутреннему пути [54].

Развитие ЦШ и образование больших количеств цитокинов может приводить к дисфункции эндотелия сосудов с последующим запуском коагуляционного гемостаза [144]. Повреждение сосудов микроциркуляторного русла, вызванное дисфункцией эндотелия и образование антифосфолипидных антител может приводить к развитию ДВС-синдрома [21]. По этой причине повышенный уровень D-димера и изменения в коагулограмме, свидетельствующие о гиперкоагуляции, являются прогностически неблагоприятными признаками и коррелируют с высоким риском смертности людей при тяжелом течении COVID-19 [83].

Различные исследования показали, что в сыворотке крови пациентов, болеющих COVID-19, содержатся в большом количестве иммунные комплексы и аутоантитела, которые способны активировать систему комплемента через C3 компонент [137]. По этой причине оправдано применений в лечении COVID-19 ингибиторов C3 компонента системы комплемента [98]. Кроме того, нуклеокапсид вируса COVID-19 может запускать работу системы комплемента через лектиновый путь [126]. В итоге активация системы комплемента приводит к стимуляции НГ, повреждению тканей с высвобождением тканевого фактора. Последний активирует тромбоциты, запуская процесс тромбообразования [114].

Такие заболевания, как сахарный диабет, гипертоническая болезнь и ожирение, наиболее часто являются факторами риска тяжелого протекания COVID-19. Отмечается довольно высокая летальность среди пациентов с диабетической формой коронавирусной инфекции. Считается, что причиной этого служит чрезмерная активация провоспалительного отве-

та и нарушение работы в системе врожденного иммунитета [25, 113]. Кроме того, гипергликемия стимулирует НГ и индуцирует образование NETs, влияет и на высвобождение Са-связывающего белка S100, который стимулирует высвобождение печеночного тромбопоэтина с запуском процесса тромбообразования [56].

Возрастные группы старческого и пожилого возраста, имеющие такие сопутствующие заболевания, как сахарный диабет, гипертоническая болезнь, хронические заболевания почек, склонны наиболее тяжело переносить инфекцию, вызванную SARS-CoV-2 [24]. Было отмечено, что у пациентов данных возрастных групп, тромбоциты менее стабильны и склонны к чрезмерной активации под влиянием воздействия NETs [147]. Также было установлено, что при ассоциации COVID-19 с сахарным диабетом у пациентов повышена выработка IL-6, что также отягощает течение инфекционно-воспалительного процесса [81]. Не рекомендуется назначать пациентам пожилого и старческого возраста липидсодержащие статины, так как их применение ассоциируется с усилением образования NETs [68].

Приведенные выше данные экспериментальных и клинических работ были подтверждены результатами аутопсии. Так было показано, что у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции отмечены: значительная инфильтрация легочной паренхимы НГ, отложения конгломератов NETs и фибрина в капиллярах, что вызвало острый капиллярит [29]. Гистологическое исследование легкого при развитии ARDS показало окклюзию легочных сосудов конгломератами NETs, что значительно реже наблюдалось при пневмонии, вызванной вирусами гриппа [100, 105].

Ретроспективное исследование, проведенное в группе пациентов с COVID-19, показало, что нейтрофилия и интенсивность образования NETs коррелируют с высоким процентом поражения легочной паренхимы, выявленного при проведении компьютерной томографии [143].

Таким образом, при коронавирусной инфекции иммунные механизмы направлены на формирование острого воспаления и уничтожение SARS-CoV-2, но чрезмерный гиперактивный характер иммунного реагирования обусловливает необратимое поражение тканей [29]. Цитокиновый шторм при COVID-19 приводит к развитию ARDS, полиорганной недостаточности и может быть причиной летального исхода [76]. Гиперактивация НГ и NETs, опосредованная действием провоспалительных цитокинов, хемокинов и циркулирующих гистонов может приводить к прогрессированию неконтролируемого системного гипервоспаления, усилению респираторной декомпенсации, микротромбозу, неадекватному иммунному ответу и в конечном итоге к критическому течению COVID-19. Поэтому в основе поиска возможных адекватных терапевтических воздействий на SARS-CoV-2 должна лежать иммунотерапевтическая регуляция патологических гиперэргических реакций иммунной системы, включающая в том числе, сдерживание гиперактивации НГ и ограничение образования NETs.

Терапевтические стратегии, направленные на борьбу с NETs-опосредованными заболеваниями при COVID-19

Создание для лечения COVID-19 новых терапевтических подходов, направленных на сдерживание гиперактивации НГ и ограничение образования NETs и связанных с ними процессов воспаления является сложной задачей из-за необходимости соблюдения тонкого баланса между иммуносупрессивными воздействиями биологических антицитокиновых препаратов, которые должны ограничить выраженность слишком интенсивной патологической воспалительной реакции при ЦШ, и возникающей на этом фоне вторичной иммуносупрессии, что увеличивает риск возникновения бактериальных инфекций, осложняющих течение заболевания.

Показано, что комбинация противовирусной, противовоспалительной и антикоагулянтной терапии эффективно ингибирует активность SARS-CoV-2 и снижает нарушения регуляции иммунных реакций при COVID-19 [86, 131]. Высказано также предположение, что иммуномодулирующие методы лечения могут снизить уровень медиаторов воспаления и образование NETs, не нарушая при этом бактериальный клиренс. Это открывает новые возможности терапии данных пациентов [131].

При тяжелой форме COVID-19 критической проблемой является инициированное макрофагами и НГ воспаление легких с последующим развитием ARDS. Подавление аберрантной активации НГ может обеспечить эффективную стратегию лечения ARDS, связанного с COVID-19 [123].

В настоящее время возможно применение уже существующих лекарственных препаратов, и разрабатывается целый ряд новых лекарственных средств, иммуномодулирующее действие которых может регулировать количество НГ, позитивно влиять на функции НГ, ограничивать интенсивность формирования NETs, что позволяет предположить возможную перспективность их применения в лечении ARDS при COVID-19.

Биологические антицитокиновые препараты на основе моноклональных антител

Провоспалительные цитокины, такие как TNFα, IL-17, IL-6 и IL-8, могут индуцировать формирование NETs НГ. Впоследствие NETs способствуют большей выработке цитокинов и возникновению стойкого воспаления [61, 75, 76, 111, 115, 145]. При COVID-19 компоненты NETs участвуют как на ранних, так и на поздних стадиях [111] и могут играть ключевую роль в активации макрофагов и процессинге провоспалительных цитокинов [75].

Терапия биологическими препаратами на основе моноклональных антител, к которым относятся антагонисты IL-6 и его рецептора, препараты, направленные на блокирование цитокинов IL-1, IL-17, IL-8 и их рецепторов, а также ингибиторы янус-киназ, стала золотым стандартом патогенетической терапии ЦШ при COVID-19.

Антагонисты IL-6 и его рецептора

Ключевую и центральную роль среди цитокинов, участвующих в патогенезе ЦШ при COVID-19, имеет IL-6 [3, 27].

IL-6 отличается своей плейотропностью благодаря уникальной сигнальной системе, состоящей из IL-6-рецептора (IL-6R) и нисходящих сигнальных молекул, активируя по механизму положительной обратной связи Th17-клетки, Tfh-клетки, $CD8^+$ Т-лимфоциты и другие иммунные клетки и вызывая гиперреакцию иммунной системы при COVID-19 [8].

Показано, что IL-6 может индуцировать образование NETs НГ условно здоровых людей *in vitro* [75]. Также установлено, что IL-6 может стимулировать созревание В-клеток в плазматические клетки, которые способны продуцировать антигены цитруллинированного белка (ACPA), тем самым косвенно способствуя образованию NETs [111].

Для лечения пациентов с COVID-19 широко использовались препараты на основе моноклональных антител (МкАТ) к IL-6 и его рецепторам (IgG1). Согласно временным методическим рекомендациям, тоцилизумаб рекомендован к применению пациентам с тяжелым течением, а сарилумаб и левилимаб — при среднетяжелом течении болезни [3].

Олокизумаб — гуманизированное МкАТ, относящееся к изотипу иммуноглобулина G4/κ. IL-6 взаимодействует с двумя рецепторами, gp80 (также известным как рецептор IL-6 (IL-6R), CD126) и корецепторной молекулой, передающей сигнал. Олокизумаб селективно связывается с IL-6, нейтрализуя эффекты IL-6, блокируя gp130 (CD130) и сигнальные пути, не связывается в значительной степени с другими молекулами семейства IL-6 и не влияет на их функционирование [1, 121]. Эффективность МкАТ для лечения осложнений у пациентов с тяжелым и критическим течением COVID-19 и борьбой с ЦШ связана с тем, что они направленно действуют на сигнальные пути IL-6.

Тоцилизумаб — рекомбинантное гуманизированное МкАТ к рецептору IL-6. Способен селективно связываться, подавляя как растворимые, так и мембранные рецепторы IL-6 (sIL-6R и mIL-6R). При этом отмечается снижение уровня сывороточного С-реактивного белка у пациентов с COVID-19 [57, 128, 150].

Сарилумаб — МкАТ к рецептору IL-6, специфически связывается с растворимыми и с мембранными рецепторами IL-6 (IL-6Rα), подавляя IL-6-опосредованную передачу сигнала с вовлечением сигнального белка гликопротеина 130 (gp130) и STAT-3 белков (трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции-3). Сарилумаб способен блокировать сигнальный путь IL-6, измеряемый по степени подавления STAT-3 белков, только в присутствии IL-6 [92].

Левилимаб — рекомбинантное МкАТ к рецептору IL-6. Левилимаб связывается и блокирует sIL-6R и mIL-6R, что позволяет предотвратить развитие IL-6-ассоциированного провоспалительного каскада, в том числе препятствует активации АПК, В- и Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов, эндотелиальных клеток, фибробластов и избыточной продукции других провоспалительных цитокинов [4, 91].

Антагонисты цитокинов IL-1, IL-17, IL-8 и их рецепторов

IL-1β — провоспалительный цитокин, который участвует в патогенезе аутовоспалительных состояний, индуцирует продукцию вторичных медиаторов воспаления, включая IL-6. IL-1β и NETs, образуя петлю обратной связи, которая способствует развитию ARDS у пациентов с COVID-19 [46, 152].

Канакинумаб — гуманизированное МкАТ IgG1/κ к IL-1β с высоким аффинитетом связывается с IL-1β, предотвращая взаимодействие IL-1β с его рецепторами, IL-1β-индуцированную активацию генов и продукцию медиаторов воспаления, таких как IL-6 и циклооксигеназа-2. Назначается при невозможности использования или неэффективности тоцилизумаба или сарилумаба [41].

Анакинра — рекомбинантная версия антагониста рецептора IL-1 человеческого, продуцированного штаммом *E. coli*. Блокирует биологическую активность IL-1α и IL-1β путем кон-

курентного ингибирования их связей с рецептором IL-1. Назначается как препарат первого выбора и при неэффективности тоцилизумаба или сарилумаба [42, 67].

IL-17A — провоспалительный цитокин, гиперпродукция которого преимущественно обусловлена активацией Th17-лимфоцитов. В рамках врожденного иммунитета IL-17A выполняет защитную роль. При хронических иммуновоспалительных заболеваниях патологическая активация Th17-лимфоцитов и гиперпродукция IL-17A стимулирует Т-клеточный ответ, миграцию НГ и усиленную продукцию других медиаторов воспаления: IL-1, IL-6, TNFα, факторов роста (G-CSF, GM-CSF) и различных хемокинов. Ингибирование IL-17A может оказывать положительное влияние на ряд ключевых факторов патогенеза COVID-19 и рассматриваться как перспективная мишень в терапии данного заболевания [5]. В частности, при COVID-19 использовался нетакимаб — рекомбинантное гуманизированное МкАТ, в терапевтических концентрациях специфически связывающее IL-17A [10, 108]. Также известны другие лекарственные препараты, нейтрализующие IL-17A, используемые для лечения аутоиммунных заболеваний, в патогенезе которых не последняя роль отводится образованию NETs.

Секукинумаб — полностью человеческое антитело IgG1, селективно связывающее и нейтрализующее IL-17A. Иксекизумаб — гуманизированное МкАТ к цитокину IL-17A и IL-17A/F из подкласса иммуноглобулинов IgG4.

Бродалумаб — с высокой аффинностью связывается с рецептором А IL-17; препарат ингибирует сигнальный путь воспаления, блокируя связь некоторых IL-17 лигандов и рецептора [40, 43].

IL-8, секретируемый макрофагами и эпителиальными клетками, является хемоаттрактантом НГ и Т-клеток при воспалительном процессе. Связывание IL-8 с CXCR2 на НГ приводит к высвобождению NETs, тем самым вызывая гипервоспаление. Было показано, что широкий спектр агонистов хемокиновых рецепторов CXCR2 индуцирует NETs *in vivo* [133]. Следует предположить, что целенаправленное ингибирование активации НГ и высвобождения NETs может быть достигнуто с помощью антагонистов нейтрофильного хемокинового рецептора CXCR2.

HuMax-IL8 — полностью человеческое МкАТ, ингибирует IL-8, способствующий прогрессированию опухоли и ускользанию от иммунного ответа; представляет собой новый разработанный для противоопухолевого лечения препарат [34]. В настоящее время HuMax-IL8 проходит клинические испытания для применения у пациентов с COVID-19 [43]. Низкомолекулярные антагонисты CXCR2: данириксин и навариксин — доступные ингибиторы НГ — были широко протестированы в клинических испытаниях при астме, ХОБЛ, при легочных заболеваниях, включая бронхоэктазы, вирус-ассоциированные легочные инфекции, и при гриппе [64, 84, 93, 138]. Учитывая их механизм влияния на НГ они могут представлять собой интерес и как препараты для лечения ARDS у пациентов с COVID-19 [104].

Ингибиторы JAKs

На включение в основной арсенал препаратов для таргетной терапии при SARS-CoV-2 могут претендовать и ингибиторы янус-киназ (JAKs). Тяжелое течение SARS-CoV-2 ассоциируется с дисрегуляцией воспалительных процессов, и еще одним из путей передачи сигналов, используемых рецепторами цитокинов является путь — JAK-STAT. JAKs являются цитоплазматическими тирозинкиназами, экспрессируются во всех клетках, и являются ключевыми игроками в передаче сигналов IFN. В рамках отечественных рекомендаций на амбулаторном этапе при среднетяжелом течении заболевания назначаются ингибиторы JAKs в сочетании с этиотропными препаратами [3].

Барицитиниб — селективный и обратимый ингибитор JAK1 и JAK2, механизм действия связан с подавлением сигнализации JAK1/2-зависимых цитокинов (IL-2, 6, 10, IFNα, IFNγ, GM-CSF и др.), участвующих в развитии гипервоспаления при COVID-19. Кроме того, барицитиниб обладает способностью предотвращать инфицирование и репликацию SARS-CoV-2 в клетках альвеол [49, 74].

Тофацитиниб — селективный ингибитор семейства JAKs, обладающий высокой селективностью. Ингибирует JAKs 1, 2, 3 и в меньшей степени — тирозин-киназу-2. Ингибирование JAKs-1 и JAKs-3 под действием тофацитиниба блокирует передачу сигнала посредством общих рецепторов, содержащих γ-цепи, в отношении цитокинов IL-2, 4, 7, 9, 15, 21. Тофацитиниб также модулирует действие IFN и IL-6, снижая высвобождение цитокинов хелперными клетками Th1- и Th17-типов, которые участвуют в патогенезе ARDS [58, 94].

Ингибиторы ДНКазы I

ДНКаза I (DNAseI) является генноинженерным вариантом человеческого природного фермента, который расщепляет внеклеточную ДНК. DNAseI способна сдерживать развитие вирусов герпеса, аденовирусов и др., не повреждая при этом ДНК клеток макроорганизма.

DNAseI вызывает также деполимеризацию и разжижение гноя. DNAseI с успехом применяется для лечения герпетических кератитов и кератоувеитов, аденовирусных конъюнктивитов и кератитов, абсцессов легких, острого катарального воспаления верхних дыхательных путей аденовирусной природы; для уменьшения вязкости и улучшения эвакуации мокроты и гноя при бронхоэктатической болезни, абсцессах легких, ателектазах, пневмонии; в предоперационном и послеоперационном периодах у больных с гнойными заболеваниями легких, туберкулезом легких [112]. Выдвинуто предположение, что DNAseI может служить средством для разрушения NETs при COVID-19 [112]. Так было показано, что введение дорназы альфа, одобренной FDA, с использованием небулайзера у пациентов с тяжелым ARDS, связанным с COVID-19, может способствовать растворению мокроты и замедлению прогрессирования заболевания [146]. Применение DNAseI на моделях животных с тяжелой бактериальной пневмонией и острым повреждением легких способствовало ингибированию образования NETs и улучшало их выживаемость [85]. Также было отмечено уменьшение слизистых выделений нижних дыхательных путей и улучшение вентиляции легких, замедление прогрессирования ARDS и снижение риска присоединения вторичных инфекций при применении ингаляционной формы DNAseI на фоне снижения количества определяемых NETs [157].

Ингибиторы нейтрофильной эластазы

Нейтрофильная эластаза (NE), являющаяся важным компонентом NETs, участвует в патогенезе ARDS, связанного с COVID-19, способствуя инвазии SARS-CoV-2 в клетки-хозяина, а также может напрямую повреждать легочную ткань [136]. В сыворотке крови содержатся ингибиторы протеаз α1-антитрипсин (A1AT), α2-макроглобулин, элафин преимущественной мишенью которых является NE. Использование ингибиторов NE может быть перспективным в лечении пациентов с тяжелой формой COVID-19 и ARDS [101]. Показано, что дефицит A1AT — генетически детерминированное заболевание, выявляется при ХОБЛ, эмфиземе легких, поражении печени и сосудов [7]. Пациенты с перечисленными заболеваниями относятся к группе риска по развитию тяжелого течения COVID-19 [135], и единственным специфическим средством их лечения является внутривенная аугментационная терапия человеческим A1AT, полученным из пула донорской плазмы. Элафин является мощным ингибитором NE и протеиназы 3, двух сериновых протеаз НГ, проявляет антибактериальные и противо воспалительные свойства, что делает его весьма перспективным для лечения воспалительных заболеваний легких или тяжелых реперфузионных повреждений, возникающих после инфарктов, тяжелых травм и SARS-CoV-2 [130].

В моделях на животных показано уменьшение острого повреждения легких при введении ингибиторов эластазы, таких как сивелестат [77]. В настоящее время сивелестат является единственным одобренным ингибитором NE для лечения ARDS в Корее и Японии [14]. Описаны положительные результаты лечения пациентов с ARDS сивелестатом [96]. В частности, использование дозированных аэрозолем или распылителем ингибиторов NE значительно повышает эффективность последних и снижает частоту побочных эффектов [30].

Ингибитор дипептидилпептидазы 1

Дипептидилпептидаза 1 (DPP1), также известная как катепсин С, представляет собой цистеиндипептидиламинопептидазу, которая активирует сериновые протеазы, такие как NE, во время созревания НГ. Чрезмерная активность сериновой протеазы вызывает различные воспалительные заболевания легких, такие как ARDS, и способствует развитию ХОБЛ и БА. Было обнаружено, что ингибитор DPP1 — бренсокатиб снижает активность NE у здоровых людей [109], и в настоящее время он проходит клинические испытания эффективности при бронхоэктатической болезни. Некоторыми авторами предполагается, что введение ингибиторов DPP1 может предотвратить прогрессирование ARDS, вызванного SARS-CoV-2 [78].

Ингибитор респираторного взрыва

N-ацетилцистеин — муколитический препарат с антиоксидантной активностью, применяемый при заболеваниях органов дыхания [103] и заболеваниях кожи [13], также является потенциальным терапевтическим средством для лечения COVID-19 [26]. Показано, что N-ацетилцистеин уменьшает респираторный взрыв активированных НГ, но усиливает фагоцитоз у пациентов с диагнозами «сепсис», «синдром системной воспалительной реакции» или «множественная травма» в системе *in vitro* [62]. Кроме того, введение N-ацетилцистеина обеспечивает защиту легких в различные фазы ишемически-реперфузионного повреждения, снижая воспаление [60] и подавляя формирование фиброза легких [80]. Было предложено использовать N-ацетилцистеин в сочетании с другими препаратами для лечения ARDS [26, 60, 65]. Показано, что применение в лечении N-ацетилцистеина способствует сокраще-

нию пребывания пациентов с ARDS в отделении интенсивной терапии [155]. Основываясь на вышеизложенном, следует предположить, что N-ацетилцистеин может быть полезен при лечении ARDS, вызванного SARS-CoV-2, благодаря его антиоксидантной и противовоспалительной активности при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях легких.

Ингибитор гасдермина D

Гасдермин D (GSDMD) — предшественник порообразующего белка, способствует пироптозу в ответ на микробную инфекцию и сигналы опасности, важен для формирования NETs [127]. Выявлено, что ингибитор GSDMD — дисульфирам — блокирует репликацию SARS-CoV-2 *in silico* [90]. Кроме того, дисульфирам препятствует образованию пор за счет ковалентного связывания с Cys191/Cys192 GSDMD [67]. В настоящее время проводятся клинические испытания потенциального использования дисульфирама при COVID-19, что может уменьшить формирование NETs при ARDS, вызванном SARS-CoV-2 [43].

Ингибиторы PDE4

Фосфодиэстеразы (PDE) — ферменты, которые метаболизируют внутриклеточные вторичные мессенджеры: циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). цАМФ (PDE4) присутствует в иммунных клетках, включая НГ, и способствует опосредованному НГ воспалению легких [28]. Существует ингибиторы PDE4: рофлумиласт — для лечения ХОБЛ, апремиласт — для лечения псориаза, кризаборол — для лечения атопического дерматита и дипиридамол, используемый при лечении тромбоза. Дипиридамол действует путем повышения внутриклеточного уровня цАМФ и блокирует обратный захват аденозина в клетках, что приводит к его антитромбоцитарному и сосудорасширяющему действию [132]. Несколько ингибиторов PDE были предложены в качестве подходящих препаратов для лечения COVID-19 [52]. Так было обнаружено, что дипиридамол ингибирует образование NETs [15]. В исследовании, включавшем пациентов с COVID-19, при применении дипиридамола наблюдалось улучшение состояния пациентов в тяжелых случаях, сопровождающееся значительным снижением уровня D-димера [89]. Предлагается их использование в клинике при ARDS, ассоциированном с COVID-19 [43]. Были начаты клинические испытания при COVID-19 с использованием апремиласта или энзифентрина [43].

β-адреноблокаторы

β1-блокаторы осуществляют избирательное ингибирование адренергической сигнализации. Таким образом, метопролол у больных с инфарктом миокарда вызывает «оглушение» НГ и, действуя на ранней стадии процесса рекрутирования, ингибирует их миграцию, уменьшает участие активированных циркулирующих тромбоцитов, ослабляя воспаление и уменьшая очаг инфаркта [50].

Антигистоновая терапия

Также было показано, что, как и многие медиаторы врожденного иммунитета, цитрулинированные гистоны вызывают воспалительные реакции, повреждение ЭК и активацию каскадной коагуляции [86]. После контакта патогена с рецепторами на мембране клетки происходит активация молекулярных реакций, которые приводят к выходу кальция из эндоплазматического ретикулума, вызывая повышение активности цитоплазматической деиминазы PAD4 (protein arginine deiminases 4), которая представляет собой фермент, играющий важную роль в цитруллинизации гистонов в процессе нетоза [2]. В дальнейшем происходит увеличение ядра НГ, ядерная оболочка распадается на везикулы, мембраны гранул и митохондрий разрушаются, что приводит к смешению цитоплазмы, кариоплазмы и антибактериальных пептидов. Белки гранул адсорбируются на отрицательно заряженных фибриллах деконденсированного хроматина, который служит каркасом для ловушки. В итоге клеточная мембрана разрывается, содержимое клетки выбрасывается наружу и, разворачиваясь в пространстве, образует NETs [37]. Гистоны проявляют эндотелиальную и эпителиальную цитотоксичность, взаимодействуя как с фосфолипидами клеточной мембраны, так и с TLR клеточной мембраны и системой комплемента, тем самым способствуя высвобождению провоспалительных цитокинов и хемокинов через инфламмасомы MyD88, NF-κB и NLRP3-зависимый путь. Кроме того, гистоны могут активировать тромбоциты, индуцируя воздействие фосфатидилсерина, что в конечном итоге приводит к развитию микротромбозов [36, 120, 124]. Провоспалительные, прокоагулянтные и цитотоксические функции внеклеточных гистонов, действующие как DAMP [102, 124] представляют собой последовательность иммунных реакций, которые могут активно способствовать ухудшению клинического течения COVID-19 и увеличению риска неблагоприятных исходов [36]. Недавно проведенное исследование указывает на зна-

чительную корреляцию между уровнями гистонов в плазме крови и тяжестью инфекции COVID-19 [120]. Впервые было продемонстрировано, что циркулирующие гистоны играют решающую роль и тесно связаны с тяжелой коагулопатией, воспалением и поражением кардиомиоцитов, что стало ключевым признаком тяжелого течения и повышенной смертности при COVID-19 [87]. Также было обнаружено, что высокий уровень циркулирующих гистонов свидетельствует об увеличении гибели клеток, в частности лимфоцитов с развитием лимфопении и НГ путем нетоза, при этом уровни циркулирующих гистонов в значительной степени коррелируют с уровнями IL-6 и белков острой фазы, включая фибриноген и СРБ, что указывает на индуцированный гистонами ответ острой фазы у пациентов с COVID-19 [120]. Недавняя медицинская гипотеза предполагает, что гистоны, секретируемые НГ при COVID-19 (поликатионы) могут усугублять течение вирусных инфекций, на которые можно воздействовать введением отрицательно заряженных полианионных препаратов (например, гепаринов и гепариноидов) [51]. В частности, лечение COVID-19 гепаринами и гепариноидами продемонстрировало их благотворное влияние через сложные биомолекулярные механизмы, основанные как на неантикоагулянтных, так и на антикоагулянтных свойствах [39, 69, 88, 119]. Согласно этому проводились различные исследования, в рамках которых наблюдали значительно отличающуюся *in vitro* модуляцию индуцированного гистонами воспаления и коагуляции цельной крови несколькими синтетическими и природными гепаринами и гепариноидами на основе гликозаминогликанов, часто используемыми для лечения COVID-19 в соответствии с рекомендациями ВОЗ по состоянию на 5 февраля 2022 г., такие как нефракционированный гепарин, низкомолекулярные гепарины (НМГ), данапароид натрия, фондапаринукс и сулодексид [33, 39, 129]. Более того, недавний отчет показал, что другие полианионы, такие как смесь олигонуклеотидов дефибротид [122], могут действовать как агенты, нейтрализующие гистоны, тем самым блокируя их патологические эффекты и защищая эндотелий от иммунотромбоза. В дополнение к их хорошо известным ролям и функциям в качестве антикоагулянтов и профибринолитических соединений, отмечается их особая высокая плотность отрицательного заряда, что позволяет им связываться и взаимодействовать с несколькими белками и протеиназами, проявляя противовоспалительные, антикомплементарные, иммуномодулирующие и антидепрессивные свойства вирусной активности независимо от антикоагулянтных свойств [19, 39, 45, 55, 69, 70, 88, 95, 119, 122]. Более того, определение гистонов можно рассматривать как новый биомаркер, который может помочь в стратификации риска у пациентов с COVID-19 [120] и служить прогностическим фактором повреждения сердечной и легочной ткани, а также быть полезным для индивидуального управления антикоагулянтной терапией [63, 66].

Следует заключить, что ни один из препаратов, доступных в настоящее время для воздействия на NETs, не является специфичным. Тем не менее, в совокупности существует несколько индивидуальных или комбинированных и, вероятно, безопасных терапевтических стратегий, доступных на сегодня для противодействия NETs у пациентов с COVID-19. NETs при этом могут быть подходящим биомаркером для проведения исследований и проверки их эффективности. Основываясь на вышеизложенном, следует предположить, что ингибиторы DNAse, NE, DPP1, N-ацетилцистеин, GSDMD, PDE4, β-блокаторы, полианионные препараты могут предотвратить прогрессирование ARDS, вызванного SARS-CoV-2. Данные препараты представляют интерес и были предложены в качестве подходящих для лечения COVID-19 и в дальнейшем предлагается их клиническое рассмотрение при ARDS, ассоциированном с COVID-19 [151].

Заключение

В клинической иммунологии давно сложились устойчивые стереотипы, характеризующие определенное дифференцированное реагирование клеток иммунной системы на вирусную и бактериальную инфекции. Так, нейтрофилез и «сдвиг влево» характерен для острой или обострения хронической бактериальной инфекции, а нейтропения и лимфоцитоз характерны для острой и хронической вирусной инфекции. В то же время при тяжелом COVID-19 наблюдается другая картина: нейтрофилез и лимфопения. Отмечается, что при тяжелом COVID-19 на фоне выраженного регуляторного дисбаланса иммунной системы имеет место необычность, извращенность и двойственность ее функционирования: от дефицита IFN I типа, дисфункций и дефицита Т- и В-лимфоцитов до нейтрофилеза, неттингующих нейтрофилов, формирующих NETs, гиперактивности макрофагов и гиперцитокинемии провоспалительных цитокинов, ведущей к возникновению «цитокинового шторма».

Анализируя роль НГ в патогенезе COVID-19, необходимо отметить их важнейшую парадоксальную роль в иммунопатогенезе этой необычной респираторной вирусной инфекции. У пациентов с тяжелой и критично тяжелой

формой COVID-19 вирус SARS-CoV-2 индуцирует нейтрофилез, ассоциированный с их гиперактивностью, усиление процессов формирования большого количества NETs. NETs совместно с активированными тромбоцитами способствуют образованию микро- и макроиммунотромбозов. Развивается поражение клеток эндотелия, васкулит и иммунотромбирование сосудов малого, среднего и крупного калибра, что дополнительно, на фоне дисрегуляторных процессов в иммунной системе, приводит не только к развитию ARDS, но и появлению мультиорганных расстройств.

В данном обзоре нами проанализирован достаточно большой объем научной литературы, посвященный особенностям формирования NETs, их роли в патогенезе COVID-19, участия в возникновении иммунотромбозов, васкулита, ARDS, мультиорганных поражений. Приведены убедительные данные, четко указывающие на значительное участие NETs в иммунопатогенезе COVID-19 и связанными с ними тяжелыми осложнениями, возникающими в результате усиления процесса воспаления, который является ключевым для течения инфекции SARS-CoV-2. Продемонстрированная роль НГ и NETs, наряду с ролью других клеток иммунной системы и провоспалительными цитокинами, чрезвычайно важна в понимании развития гиперактивного иммунного ответа при тяжелой COVID-19. Полученные научные результаты, доступные на сегодняшний день, позволяют идентифицировать возможности регуляторных воздействий на гиперактивированные НГ, на процессы формирования NETs на различных этапах и на ограничение негативного воздействия уже сформированных NETs на различные ткани и органы. Все вышеперечисленное должно помочь в создании новых, специализированных иммунотерапевтических стратегий, предназначенных для увеличения шансов на выживание, уменьшения тяжести клинических проявлений у пациентов с COVID-19, а также в значительном снижении показателей смертности.

Продолжение исследований роли гиперактивированных НГ и нетоза, а также понимание механизмов регуляции феномена образования и ограничения активности NETs при тяжелом COVID-19, по-видимому, являются приоритетными, поскольку в дальнейшем полученные новые данные могли бы помочь в разработке таргетных подходов не только к иммунотерапии, направленной на ограничение образования и блокирование негативных воздействий уже сформировавшихся NETs при тяжелом COVID-19, но и к иммунотерапии, которую можно было бы использовать в комплексном лечении других нетопатий, в первую очередь, аутоиммунных болезней, аутовоспалительных синдромов, тяжелых гнойно-воспалительных процессов, в том числе бактериального сепсиса и гематогенного остеомиелита.

Список литературы/References

1. Антонов В.Н., Игнатова Г.Л., Прибыткова О.В., Слепцова С.С., Стребкова Е.А., Худякова Е.А., Симакова А.И., Рабец С.Ю., Тихонова Е.П., Курмаева Д.Ю., Петрушин М.А., Машков А.С., Гаязова Е.В., Яшева И.В., Андреев М.А., Хиновкер В.В., Карпунин А.Ю., Бережанский Б.В. Опыт применения олокизумаба у пациентов с COVID-19 // Терапевтический архив. 2020. Т. 92, № 12. С. 148–154. [Antonov V.N., Ignatova G.L., Pribytkova O.V., Sleptsova S.S., Strebkova E.A, Khudyakova E.A., Simakov A.I., Rabets S.Y., Tikhonova E.P., Kurmaeva D.Y., Petrushin M.A., Mashkov A.S., Gayazova E.V., Yasheva I.V., Andreev M.A., Khinovker V.V., Karpunin A.Y., Berezhanskiy B.V. Experience of olokizumab use in COVID-19 patients. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive, 2020, vol. 92, no. 12, pp. 148–154. (In Russ.)*] *doi: 10.26442/00403660.2020.12.200522*
2. Бицадзе В.О., Слуханчук Е.В., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Шкода А.С., Радецкая Л.С., Макацария А.Д., Элалами И., Грис Ж.-К., Грандоне Э. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) в патогенезе тромбоза и тромбовоспалительных заболеваний // Вестник РАМН. 2021. Т. 76, № 1. С. 75–85. [Bitsadze V.O., Slushanchuk E.V., Khizroeva D.H., Tretyakova M.V., Skoda A.S., Radetskaya L.S., Makatsaria A.D., Elalami I., Gris J.-K., Grandone E. Extracellular neutrophil traps (NETs) in the pathogenesis of thrombosis and thromboinflammatory diseases. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences, 2021, vol. 76, no. 1, pp. 75–85. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/vramn1395*
3. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 16 от 18.08.2022. 248 с. [Interim guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 16 dated 18.08.2022. 248 p. *(In Russ.)*]
4. Городин В.Н., Мойсова Д.Л., Зотов С.В., Ванюков А.А., Чумакова Ю.Е. Проактивная противовоспалительная терапия левилимабом у пациентов с COVID-19 // Инфекционные болезни. 2021. Т. 19, № 3. С. 14–23. [Gorodin V.N., Moisova D.L., Zotov S.V., Vanyukov A.A., Chumakova Yu.E. Proactive anti-inflammatory therapy with levilimab for patients with COVID-19. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases, 2021, vol. 19, no. 3, pp. 14–23. (In Russ.)*] *doi: 10.20953/1729-9225-2021-3-14-23*
5. Гудима Г.О., Хаитов Р.М., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Молекулярно-иммунологические аспекты диагностики, профилактики и лечения коронавирусной инфекции // Иммунология. 2021. Т. 42, № 3. С. 198–210. [Gudima G.O., Khaitov R.M., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Molecular immunological aspects of diagnosis, prevention and treatment of corona-

virus infection. *Immunologiya = Immunologiya, 2021, vol. 42, no. 3, pp. 198–210. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-198-210*

6. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН, 2009. 208 с. [Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophil extracellular traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. *Moscow: Publishing house RAMS, 2009. 208 p. (In Russ.)*]
7. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98, № 5. С. 567–578. Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. The role of plasma inhibitor of serine leukocyte proteinases in protecting the body from COVID-19. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2021, vol. 98, no. 5, pp. 567–578. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-160*
8. Насонов Е.Л. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19): фокус на интерлейкин 6 // Научно-практическая ревматология. 2020. Т. 58, № 3. С. 245–261. [Nasonov E.L. Immunopathology and immunopharmacotherapy of coronavirus disease 2019 (COVID-19): focus on interleukin 6. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice, 2020, vol. 58, no. 3, pp. 245–261. (In Russ.)*] *doi: 10.14412/1995-4484-2020-245-261*
9. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Тараканов В.А., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Русинова Т.В., Евглевский А.А., Малиновская В.В. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений. М.: Capricorn Publishing, UK, USA, 2018. 338 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Tarakanov V.A., Lomtatidze L.V., Kolesnikova N.V., Rusinova T.V., Evglevsky A.A., Malinovskaya V.V. Neutrophil granulocytes: reflection in the mirror of modern ideas. *Moscow: Capricorn Publishing, UK, USA, 2018. 338 p. (In Russ.)*]
10. Шатохина Е.А., Полонская А.С., Мершина Е.А., Серединина Е.М., Плисюк А.Г., Георгинова О.А., Краснова Т.Н., Павликова Е.П., Орлова Я.А., Синицын В.Е., Круглова Л.С., Камалов А.А. Возможная роль препаратов против IL17 в лечении COVID-19 — наш собственный опыт и обзор литературы // Иммунология. 2021. Т. 42, № 3. С. 243–253. [Shatokhina E.A., Polonskaia A.S., Mershina E.A., Seredenina E.M., Plisyuk A.G., Georginova O.A., Krasnova T.N., Pavlikova E.P., Orlova Ya.A., Sinitsyn V.E., Kruglova L.S., Kamalov A.A. Possible role of anti-IL17 drugs in the management of COVID-19 — our own experience and literature review. *Immunologiya = Immunologiya, 2021, vol. 42, no. 3, pp. 243–253. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-243-253*
11. Abrams S.T., Zhang N., Manson J., Liu T., Dart C., Baluwa F., Wang S.S., Brohi K., Kipar A., Yu W., Wang G., Toh C.H. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2013, vol. 187, no. 2, pp. 160–169. doi: 10.1164/rccm.201206-1037OC*
12. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F., Vanstapel A., Werlein C., Stark H., Tzankov A., Li W.W., Li V.W., Mentzer S.J., Jonigk D. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N. Engl. J. Med., 2020, vol. 383, no. 2, pp. 120–128. doi: 10.1056/NEJMoa2015432*
13. Adil M., Amin S.S., Mohtashim M. N-acetylcysteine in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol., 2018, vol. 84, pp. 652–659. doi: 10.4103/ijdvl.IJDVL_33_18*
14. Aikawa N., Kawasaki Y. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Ther. Clin. Risk Manage, 2014, vol. 10, pp. 621–629. doi: 10.2147/TCRM.S65066*
15. Ali R.A., Gandhi A.A., Meng H., Yalavarthi S., Vreede A.P., Estes S.K., Palmer O.R., Bockenstedt P.L., Pinsky D.J., Greve J.M., Diaz J.A., Kanthi Y., Knight J.S. Adenosine receptor agonist protects against NETosis and thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Nat. Commun., 2019, vol. 10, no. 1: 1916. doi: 10.1038/s41467-019-09801-x.9*
16. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I. Acute kidney injury and COVID-19. *Egypt. J. Intern. Med., 2021, vol. 33, no. 1: 34. doi: 10.1186/s43162-021-00064-x*
17. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Abdullah S.M., Cruz-Martins N., Batiha G.E. Case report: hyperbilirubinemia in gilbert syndrome attenuates Covid-19-induced metabolic disturbances. *Front. Cardiovasc. Med., 2021, vol. 8: 642181. doi: 10.3389/fcvm.2021.642181*
18. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Alblihed M., Guerreiro S.G., Cruz-Martins N., Batiha G.E. COVID-19 in Relation to Hyperglycemia and Diabetes Mellitus. *Front. Cardiovasc. Med., 2021, vol. 8: 644095. doi: 10.3389/fcvm.2021.644095*
19. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Al-Hussaniy H.A., Al-Harcan N.A.H., Alexiou A., Batiha G.E. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Covid-19: a new frontiers for therapeutic modality. *Int. Immunopharmacol., 2022, vol. 104: 108516. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108516*
20. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Atanu F.O., El-Zamkan M.A., Diab H.M., Ahmed A.S., Al-Maiahy T.J., Obaidullah A.J., Alshehri S., Ghoniem M.M., Batiha G.E. Maternal transmission of SARS-CoV-2: safety of breastfeeding in infants born to infected mothers. *Front. Pediatr., 2021, vol. 9: 738263. doi:10.3389/fped.2021.738263*
21. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusti S., Alshammari E.M., Atanu F.O., Batiha G.E. Arginine vasopressin and pathophysiology of COVID-19: an innovative perspective. *Biomed. Pharmacother., 2021, vol. 143: 112193. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112193*
22. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusty N., Alexiou A., Batiha G.E. Impact of sitagliptin on non-diabetic Covid-19 patients. *Curr. Mol. Pharmacol., 2022, vol. 15, no. 4, pp. 683–692. doi: 10.2174/1874467214666210902115650*
23. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusty N., Cruz-Martins N., El-Saber Batiha G. Sequential doxycycline and colchicine combination therapy in Covid-19: the salutary effects. *Pulm. Pharmacol. Ther., 2021, vol. 67: 102008. doi: 10.1016/j.pupt.2021.102008*
24. Al-Kuraishy H.M., Hussien N.R., Al-Naimi M.S., Al-Buhadily A.K., Al-Gareeb A.I., Lungnier C. Renin–angiotensin system and fibrinolytic pathway in COVID 19: one way skepticism. *Biomed. Biotechnol. Res. J., 2020, vol. 4: 5. doi: 10.4103/bbrj.bbrj_105_20*

25. Al-Kuraishy H.M., Sami O.M., Hussain N.R., Al-Gareeb A.I. Metformin and/or vildagliptin mitigate type II diabetes mellitus induced-oxidative stress: the intriguing effect. *J. Adv. Pharm. Technol. Res., 2020, vol. 11, no. 3, pp. 142–147. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_18_20*
26. Andreou A., Trantza S., Filippou D., Sipsas N., Tsiodras S. COVID-19: the potential role of copper and N-acetylcysteine (NAC) in a combination of candidate antiviral treatments against SARS-CoV-2. *In Vivo, 2020, vol. 34, pp. 1567–1588. doi: 10.21873/invivo.11946*
27. Azkur A.K., Akdis M., Azkur D., Sokolowska M., van de Veen W., Brüggen M.C., O'Mahony L., Gao Y., Nadeau K., Akdis C.A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy, 2020, vol. 75, no. 7, pp. 1564–1581. doi: 10.1111/all.14364*
28. Baillie G.S., Tejeda G.S., Kelly M.P. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nat. Rev. Drug. Discov., 2019, vol. 18, no. 10, pp. 770–796. doi: 10.1038/s41573-019-0033-4*
29. Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M., Daßler-Plenker J., Guerci P., Huynh C., Knight J.S., Loda M., Looney M.R., McAllister F., Rayes R., Renaud S., Rousseau S., Salvatore S., Schwartz R.E., Spicer J.D., Yost C.C., Weber A., Zuo Y., Egeblad M. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med., 2020, vol. 217, no. 6: e20200652. doi: 10.1084/jem.20200652*
30. Barth P., Bruijnzeel P., Wach A., Sellier Kessler O., Hooftman L., Zimmermann J., Naue N., Huber B., Heimbeck I., Kappeler D., Timmer W., Chevalier E. Single dose escalation studies with inhaled POL6014, a potent novel selective reversible inhibitor of human neutrophil elastase, in healthy volunteers and subjects with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros., 2020, vol. 19, no. 2, pp. 299–304. doi: 10.1016/j.jcf.2019.08.020*
31. Barton L.M., Duval E.J., Stroberg E., Ghosh S., Mukhopadhyay S. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *Am. J. Clin. Pathol., 2020, vol. 153, no. 6, pp. 725–733. doi: 10.1093/ajcp/aqaa062*
32. Belen-Apak F.B., Sarıalioğlu F. Pulmonary intravascular coagulation in COVID-19: possible pathogenesis and recommendations on anticoagulant/thrombolytic therapy. *J. Thromb. Thrombolysis, 2020, vol. 50, no. 2, pp. 278–280. doi: 10.1007/s11239-020-02129-0*
33. Bikdeli B., Madhavan M.V., Gupta A., Jimenez D., Burton J.R., Der Nigoghossian C., Chuich T., Nouri S.N., Dreyfus I., Driggin E., Sethi S., Sehgal K., Chatterjee S., Ageno W., Madjid M., Guo Y., Tang L.V., Hu Y., Bertoletti L., Giri J., Cushman M., Quéré I., Dimakakos E.P., Gibson C.M., Lippi G., Favaloro E.J., Fareed J., Tafur A.J., Francese D.P., Batra J., Falanga A., Clerkin K.J., Uriel N., Kirtane A., McLintock C., Hunt B.J., Spyropoulos A.C., Barnes G.D., Eikelboom J.W., Weinberg I., Schulman S., Carrier M., Piazza G., Beckman J.A., Leon M.B., Stone G.W., Rosenkranz S., Goldhaber S.Z., Parikh S.A., Monreal M., Krumholz H.M., Konstantinides S.V., Weitz J.I., Lip G.Y.H.; Global COVID-19 Thrombosis Collaborative Group. Pharmacological agents targeting thromboinflammation in COVID-19: review and implications for future research. *Thromb. Haemost., 2020, vol. 120, no. 7, pp. 1004–1024. doi: 10.1055/s-0040-1713152*
34. Bilusic M., Heery C.R., Collins J.M., Donahue R.N., Palena C., Madan R.A., Karzai F., Marté J.L., Strauss J., Gatti-Mays M.E., Schlom J., Gulley J.L. Phase I trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *J. Immunother. Cancer, 2019, vol. 7, no. 1: 240. doi: 10.1186/s40425-019-0706-x*
35. Block H., Zarbock A. A fragile balance: does neutrophil extracellular trap formation drive pulmonary disease progression? *Cells, 2021, vol. 10, no. 8: 1932. doi: 10.3390/cells10081932*
36. Bouchard B.A., Colovos C., Lawson M.A., Osborn Z.T., Sackheim A.M., Mould K.J., Janssen W.J., Cohen M.J., Majumdar D., Freeman K. Increased histone-DNA complexes and endothelial-dependent thrombin generation in severe COVID-19. *Vascul. Pharmacol., 2022, vol. 142: 106950. doi: 10.1016/j.vph.2021.106950*
37. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun., 2018, vol. 10, no. 5–6, pp. 414–421. doi: 10.1159/000489829*
38. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science, 2004, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385*
39. Buijsers B., Yanginlar C., Maciej-Hulme M.L., de Mast Q., van der Vlag J. Beneficial non-anticoagulant mechanisms underlying heparin treatment of COVID-19 patients. *EBioMedicine, 2020, vol. 59: 102969. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102969*
40. Bulat V., Situm M., Azdajic M.D., Likic R. Potential role of IL-17 blocking agents in the treatment of severe COVID-19? *Br. J. Clin. Pharmacol., 2021, vol. 87, no. 3, pp. 1578–1581. doi: 10.1111/bcp.14437*
41. Caricchio R., Abbate A., Gordeev I., Meng J., Hsue P.Y., Neogi T., Arduino R., Fomina D., Bogdanov R., Stepanenko T., Ruiz-Seco P., Gónzalez-García A., Chen Y., Li Y., Whelan S., Noviello S.; CAN-COVID Investigators. Effect of canakinumab vs placebo on survival without invasive mechanical ventilation in patients hospitalized with severe COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA, 2021, vol. 326, no. 3, pp. 230–239. doi:10.1001/jama.2021.9508*
42. Cauchois R., Koubi M., Delarbre D., Manet C., Carvelli J., Blasco V.B., Jean R., Fouche L., Bornet C., Pauly V., Mazodier K., Pestre V., Jarrot P.A., Dinarello C.A., Kaplanski G. Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2020, vol. 117, no. 32, pp. 18951–18953. doi: 10.1073/pnas.2009017117*
43. Chiang C.C., Korinek M., Cheng W.J., Hwang T.L. Targeting neutrophils to treat acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease. *Front. Pharmacol., 2020, vol. 11: 572009. doi: 10.3389/fphar.2020.572009*
44. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med., 2007, vol. 13, no. 4, pp. 463–469. doi: 10.1038/nm1565*
45. Daviet F., Guervilly C., Baldesi O., Bernard-Guervilly F., Pilarczyk E., Genin A., Lefebvre L., Forel J.M., Papazian L., Camoin-Jau L. Heparin-induced thrombocytopenia in severe COVID-19. *Circulation, 2020, vol. 142, pp. 1875–1877. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049015*

46. Dinarello C.A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol., 2019, vol. 15, no. 10, pp. 612–632. doi: 10.1038/s41584-019-0277-8*
47. Dolhnikoff M., Duarte-Neto A.N., de Almeida Monteiro R.A., da Silva L.F.F., de Oliveira E.P., Saldiva P.H.N., Mauad T., Negri E.M. Pathological evidence of pulmonary thrombotic phenomena in severe COVID-19. *J. Thromb. Haemost., 2020, vol. 18, no. 6, pp. 1517–1519. doi: 10.1111/jth.14844*
48. Dwyer M., Shan Q., D'Ortona S., Maurer R., Mitchell R., Olesen H., Thiel S., Huebner J., Gadjeva M. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J. Innate Immun., 2014, vol. 6, no. 6, pp 765–779. doi: 10.1159/000363242*
49. Ely E.W., Ramanan A.V., Kartman C.E., de Bono S., Liao R., Piruzeli M.L.B., Goldman J.D., Saraiva J.F.K., Chakladar S., Marconi V.C.; COV-BARRIER Study Group. Efficacy and safety of baricitinib plus standard of care for the treatment of critically ill hospitalised adults with COVID-19 on invasive mechanical ventilation or extracorporeal membrane oxygenation: an exploratory, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Respir. Med., 2022, vol. 10, no. 4, pp. 327–336. doi: 10.1016/S2213-2600(22)00006-6*
50. García-Prieto J., Villena-Gutiérrez R., Gómez M., Bernardo E., Pun-García A., García-Lunar I., Crainiciuc G., Fernández-Jiménez R., Sreeramkumar V., Bourio-Martínez R., García-Ruiz J.M., Del Valle A.S., Sanz-Rosa D., Pizarro G., Fernández-Ortiz A., Hidalgo A., Fuster V., Ibanez B. Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat. Commun., 2017, vol. 8: 14780. doi: 10.1038/ncomms14780*
51. Ginsburg I., Fibach E. Polycations and polyanions in SARS-CoV-2 infection. *Med. Hypotheses, 2021, vol. 146: 110470. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110470*
52. Giorgi M., Cardarelli S., Ragusa F., Saliola M., Biagioni S., Poiana G., Naro F., Massimi M. Phosphodiesterase inhibitors: could they be beneficial for the treatment of COVID-19? *Int. J. Mol. Sci., 2020, vol. 21, no. 15: 5338. doi: 10.3390/ijms21155338*
53. Godement M., Zhu J., Cerf C., Vieillard-Baron A., Maillon A., Zuber B., Bardet V., Geri G. Neutrophil extracellular traps in SARS-CoV-2 related pneumonia in ICU patients: the NETCOV2 Study. *Front. Med. (Lausanne), 2021, vol. 8: 615984. doi: 10.3389/fmed.2021.615984*
54. Gould T.J., Vu T.T., Swystun L.L., Dwivedi D.J., Mai S.H., Weitz J.I., Liaw P.C. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol., 2014, vol. 34, no. 9, pp. 1977–84. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304114*
55. Gozzo L., Viale P., Longo L., Vitale D.C., Drago F. The potential role of heparin in patients with COVID-19: beyond the anticoagulant effect. A review. *Front. Pharmacol., 2020, vol. 11: 1307. doi: 10.3389/fphar.2020.01307*
56. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei C.L., Hui D.S.C., Du B., Li L.J., Zeng G., Yuen K.Y., Chen R.C., Tang C.L., Wang T., Chen P.Y., Xiang J., Li S.Y., Wang J.L., Liang Z.J., Peng Y.X., Wei L., Liu Y., Hu Y.H., Peng P., Wang J.M., Liu J.Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.J., Qiu S.Q., Luo J., Ye C.J., Zhu S.Y., Zhong N.S.; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med., 2020, vol. 382, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032*
57. Guaraldi G., Meschiari M., Cozzi-Lepri A., Milic J., Tonelli R., Menozzi M., Franceschini E., Cuomo G., Orlando G., Borghi V., Santoro A., Di Gaetano M., Puzzolante C., Carli F., Bedini A., Corradi L., Fantini R., Castaniere I., Tabbì L., Girardis M., Tedeschi S., Giannella M., Bartoletti M., Pascale R., Dolci G., Brugioni L., Pietrangelo A., Cossarizza A., Pea F., Clini E., Salvarani C., Massari M., Viale P.L., Mussini C. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol., 2020, vol. 2, no. 8: e474–e484. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30173-9*
58. Guimarães P.O., Quirk D., Furtado R.H., Maia L.N., Saraiva J.F., Antunes M.O., Kalil Filho R., Junior V.M., Soeiro A.M., Tognon A.P., Veiga V.C., Martins P.A., Moia D.D.F., Sampaio B.S., Assis S.R.L., Soares R.V.P., Piano L.P.A., Castilho K., Momesso R.G.R.A.P., Monfardini F., Guimarães H.P., Ponce de Leon D., Dulcine M., Pinheiro M.R.T., Gunay L.M., Deuring J.J., Rizzo L.V., Koncz T., Berwanger O.; STOP-COVID Trial Investigators. Tofacitinib in patients hospitalized with Covid-19 pneumonia. *N. Engl. J. Med., 2021, vol. 385, no. 5, pp. 406–415. doi: 10.1056/NEJMoa2101643*
59. Guimarães-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S., Soares R.P., Morgado F.N., Conceição-Silva F., Saraiva E.M. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2009, vol. 106, no. 16, pp. 6748–6753. doi: 10.1073/pnas.0900226106*
60. Guo D.W., Wang C.Y., Shih H.C. N-acetylcysteine and atorvastatin alleviates lung injury due to ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Chin. Med. Assoc., 2019, vol. 82, no. 12, pp. 909–914. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000193*
61. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol., 2005, vol. 66, no. 11, pp. 1146–1154. doi: 10.1016/j.humimm.2005.11.003*
62. Heller A.R., Groth G., Heller S.C., Breitkreutz R., Nebe T., Quintel M., Koch T. N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit. Care Med., 2001, vol. 29, no. 2, pp. 272–276. doi: 10.1097/00003246-200102000-00009*
63. Hogwood J., Pitchford S., Mulloy B., Page C., Gray E. Heparin and non-anticoagulant heparin attenuate histone-induced inflammatory responses in whole blood. *PLoS One, 2020, vol. 15, no. 5: e0233644. doi: 10.1371/journal.pone.0233644*
64. Holz O., Khalilieh S., Ludwig-Sengpiel A., Watz H., Stryszak P., Soni P., Tsai M., Sadeh J., Magnussen H. SCH527123, a novel CXCR2 antagonist, inhibits ozone-induced neutrophilia in healthy subjects. *Eur. Respir. J., 2010, vol. 35, no. 3, pp. 564–570. doi: 10.1183/09031936.00048509*
65. Horowitz R.I., Freeman P.R. Three novel prevention, diagnostic, and treatment options for COVID-19 urgently necessitating controlled randomized trials. *Med. Hypotheses, 2020, vol. 143: 109851. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109851*

66. Huckriede J., de Vries F., Hultström M., Wichapong K., Reutelingsperger C., Lipcsey M., Garcia de Frutos P., Frithiof R., Nicolaes G.A.F. Histone H3 cleavage in severe COVID-19 ICU patients. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2021, vol. 11: 694186. doi: 10.3389/fcimb.2021.694186*
67. Huet T., Beaussier H., Voisin O., Jouveshomme S., Dauriat G., Lazareth I., Sacco E., Naccache J.M., Bézie Y., Laplanche S., Le Berre A., Le Pavec J., Salmeron S., Emmerich J., Mourad J.J., Chatellier G., Hayem G. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *Lancet Rheumatol., 2020, vol. 2, no. 7: e393–e400. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30164-8*
68. Hussien N.R., Al-Niemi M.S., Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I. Statins and Covid-19: the neglected front of bidirectional effects. *J. Pak. Med. Assoc., 2021, vol. 71, no. 12, pp. S133–S136. doi: 10.1007/s10787-022-00988-y*
69. Iba T., Hashiguchi N., Nagaoka I., Tabe Y., Kadota K., Sato K. Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Med. Exp., 2015, vol. 3, no. 1: 36. doi: 10.1186/s40635-015-0072-z*
70. Jamil Z., Khan A.A., Khalid S., Asghar M., Muhammad K., Waheed Y. Beneficial Effects of anticoagulants on the clinical outcomes of COVID-19 patients. *Antibiotics, 2021, vol. 10, no. 11: 1394. doi: 10.3390/antibiotics10111394*
71. Jenne C.N., Wong C.H., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., McFadden G., Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell. Host Microbe, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 169–180. doi: 10.1016/j.chom.2013.01.005*
72. Jimeno S., Ventura P.S., Castellano J.M., García-Adasme S.I., Miranda M., Touza P., Lllana I., López-Escobar A. Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest., 2021, vol. 51, no. 1: e13404. doi: 10.1111/eci.13404*
73. Jorch S.K., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med., 2017, vol. 723, no. 3, pp. 279–287. doi: 10.1038/nm.4294*
74. Jorgensen S.C.J., Tse C.L.Y., Burry L., Dresser L.D. Baricitinib: a review of pharmacology, safety, and emerging clinical experience in COVID-19. *Pharmacotherapy, 2020, vol. 40, no. 8, pp. 843–856. doi: 10.1002/phar.2438*
75. Joshi M.B., Lad A., Bharath Prasad A.S., Balakrishnan A., Ramachandra L., Satyamoorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett., 2013, vol. 587, no. 14, pp. 2241–2246. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.053*
76. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., Friday S., Li S., Patel R.M., Subramanian V., Thompson P., Chen P., Fox D.A., Pennathur S., Kaplan M.J. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med., 2013, vol. 5, no. 178: 178ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3005580*
77. Kim D.H., Chung J.H., Son B.S., Kim Y.J., Lee S.G. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats. *J. Thorac. Dis., 2014, vol. 6, no. 12, pp. 1681–1689. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.11.10*
78. Korkmaz B., Lesner A., Marchand-Adam S., Moss C., Jenne D.E. Lung protection by cathepsin C inhibition: a new hope for COVID-19 and ARDS? *J. Med. Chem., 2020, vol. 63, no. 22, pp. 13258–13265. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00776*
79. Kraakman M.J., Lee M.K., Al-Sharea A., Dragoljevic D., Barrett T.J., Montenont E., Basu D., Heywood S., Kammoun H.L., Flynn M., Whillas A., Hanssen N.M., Febbraio M.A., Westein E., Fisher E.A., Chin-Dusting J., Cooper M.E., Berger J.S., Goldberg I.J., Nagareddy P.R., Murphy A.J. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes. *J. Clin. Invest., 2017, vol. 127, no. 6, pp. 2133–2147. doi: 10.1172/JCI92450*
80. Kulshrestha R., Pandey A., Jaggi A., Bansal S. Beneficial effects of N-acetylcysteine on protease-antiprotease balance in attenuating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Iran J. Basic Med. Sci., 2020, vol. 23, no. 3, pp. 396–405. doi: 10.22038/IJBMS.2020.39031.9261*
81. Lai J.J., Cruz F.M., Rock K.L. Immune sensing of cell death through recognition of histone sequences by C-type lectin-receptor-2d causes inflammation and tissue injury. *Immunity, 2020, vol. 52, no. 1, pp. 123–135.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.11.013*
82. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J., Meller S., Chamilos G., Sebasigari R., Riccieri V., Bassett R., Amuro H., Fukuhara S., Ito T., Liu Y.J., Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med., 2011, vol. 3, no. 73: 73ra19. doi: 10.1126/scitranslmed.3001180*
83. Lax S.F., Skok K., Zechner P., Kessler H.H., Kaufmann N., Koelblinger C., Vander K., Bargfrieder U., Trauner M. Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome : results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series. *Ann. Intern. Med., 2020, vol. 173, no. 5, pp. 350–361. doi: 10.7326/M20-2566*
84. Lazaar A.L., Miller B.E., Donald A.C., Keeley T., Ambery C., Russell J., Watz H., Tal-Singer R.; for 205724 Investigators. CXCR2 antagonist for patients with chronic obstructive pulmonary disease with chronic mucus hypersecretion: a phase 2b trial. *Respir. Res., 2020, vol. 21, no. 1: 149. doi: 10.1186/s12931-020-01401-4*
85. Lefrançais E., Mallavia B., Zhuo H., Calfee C.S., Looney M.R. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight., 2018, vol. 3, no. 3: e98178. doi: 10.1172/jci.insight.98178*
86. Li Y., Wan D., Luo X., Song T., Wang Y., Yu Q., Jiang L., Liao R., Zhao W., Su B. Circulating histones in sepsis: potential outcome predictors and therapeutic targets. *Front. Immunol., 2021, vol. 12: 650184. doi: 10.3389/fimmu.2021.650184*
87. Ligi D., Maniscalco R., Plebani M., Lippi G., Mannello F. Do circulating histones represent the missing link among COVID-19 infection and multiorgan injuries, microvascular coagulopathy and systemic hyperinflammation? *J. Clin. Med., 2022, vol. 11, no. 7: 1800. doi: 10.3390/jcm1107180*
88. Lippi G., Henry B.M., Favaloro E.J. The benefits of heparin use in COVID-19: pleiotropic antiviral activity beyond anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Semin. Thromb. Hemost., 2022. doi: 10.1055/s-0042-1742740*
89. Liu X., Li Z., Liu S., Sun J., Chen Z., Jiang M., Zhang Q., Wei Y., Wang X., Huang Y.Y., Shi Y., Xu Y., Xian H., Bai F., Ou C., Xiong B., Lew A.M., Cui J., Fang R., Huang H., Zhao J., Hong X., Zhang Y., Zhou F., Luo H.B. Potential therapeutic effects

of dipyridamole in the severely ill patients with COVID-19. *Acta Pharm. Sin. B, 2020, vol. 10, no. 7, pp. 1205–1215. doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.008*

90. Lobo-Galo N., Terrazas-López M., Martínez-Martínez A., Díaz-Sánchez Á.G. FDA-approved thiol-reacting drugs that potentially bind into the SARS-CoV-2 main protease, essential for viral replication. *J. Biomol. Struct. Dyn., 2021, vol. 39, no. 9, pp. 3419–3427. doi: 10.1080/07391102.2020.1764393*
91. Lomakin N.V., Bakirov B.A., Protsenko D.N., Mazurov V.I., Musaev G.H., Moiseeva O.M., Pasechnik E.S., Popov V.V., Smolyarchuk E.A., Gordeev I.G., Gilyarov M.Y., Fomina D.S., Seleznev A.I., Linkova Y.N., Dokukina E.A., Eremeeva A.V., Pukhtinskaia P.S., Morozova M.A., Zinkina-Orikhan A.V., Lutckii A.A. The efficacy and safety of levilimab in severely ill COVID-19 patients not requiring mechanical ventilation: results of a multicenter randomized double-blind placebo-controlled phase III CORONA clinical study. *Inflamm. Res., 2021, vol. 70, no. 10–12, pp. 1233–1246. doi: 10.1007/s00011-021-01507-5*
92. Lu C.C., Chen M.Y., Lee W.S., Chang Y.L. Potential therapeutic agents against COVID-19: what we know so far. *J. Chin. Med. Assoc., 2020, vol. 83, no. 6, pp. 534–536. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000318*
93. Madan A., Chen S., Yates P., Washburn M.L., Roberts G., Peat A.J., Tao Y., Parry M.F., Barnum O., McClain M.T., Roy-Ghanta S. Efficacy and safety of danirixin (GSK1325756) co-administered with standard-of-care antiviral (oseltamivir): a phase 2b, global, randomized study of adults hospitalized with influenza. *Open Forum Infect. Dis., 2019, vol. 6, no. 4: ofz163. doi: 10.1093/ofid/ofz163*
94. Maeshima K., Yamaoka K., Kubo S., Nakano K., Iwata S., Saito K., Ohishi M., Miyahara H., Tanaka S., Ishii K., Yoshimatsu H., Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon-γ and interleukin-17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum., 2012, vol. 64, no. 6, pp. 1790–1798. doi: 10.1002/art.34329*
95. Magnani H.N. Rationale for the role of heparin and related GAG antithrombotics in COVID-19 infection. *Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2021, vol. 27: 1076029620977702. doi: 10.1177/1076029620977702*
96. Maki C., Inoue Y., Ishihara T., Hirano Y., Kondo Y., Sueyoshi K., Okamoto K., Tanaka H. Evaluation of appropriate indications for the use of sivelestat sodium in acute respiratory distress syndrome: a retrospective cohort study. *Acute Med. Surg., 2019, vol. 7, no. 1: e471. doi: 10.1002/ams2.471*
97. Massberg S., Grahl L., von Bruehl M.L., Manukyan D., Pfeiler S., Goosmann C., Brinkmann V., Lorenz M., Bidzhekov K., Khandagale A.B., Konrad I., Kennerknecht E., Reges K., Holdenrieder S., Braun S., Reinhardt C., Spannagl M., Preissner K.T., Engelmann B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med., 2010, vol. 16, no. 8, pp. 887–896. doi: 10.1038/nm.2184*
98. Mastaglio S., Ruggeri A., Risitano A.M., Angelillo P., Yancopoulou D., Mastellos D.C., Huber-Lang M., Piemontese S., Assanelli A., Garlanda C., Lambris J.D., Ciceri F. The first case of COVID-19 treated with the complement C3 inhibitor AMY-101. *Clin. Immunol., 2020, vol. 215: 108450. doi: 10.1016/j.clim.2020.108450*
99. McCormick A., Heesemann L., Wagener J., Marcos V., Hartl D., Loeffler J., Heesemann J., Ebel F. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold Aspergillus fumigatus. *Microbes Infect., 2010, vol. 12, no. 12–13, pp. 928–936. doi: 10.1016/j.micinf.2010.06.009*
100. Middleton E.A., He X.Y., Denorme F., Campbell R.A., Ng D., Salvatore S.P., Mostyka M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A.C., Loda M., Cody M.J., Manne B.K., Portier I., Harris E.S., Petrey A.C., Beswick E.J., Caulin A.F., Iovino A., Abegglen L.M., Weyrich A.S., Rondina M.T., Egeblad M., Schiffman J.D., Yost C.C. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood, 2020, vol. 136, no. 10, pp. 1169–1179. doi: 10.1182/blood.2020007008*
101. Mohamed M.M.A., El-Shimy I.A., Hadi M.A. Neutrophil elastase inhibitors: a potential prophylactic treatment option for SARS-CoV-2-induced respiratory complications? *Crit. Care, 2020, vol. 24, no. 1: 311. doi: 10.1186/s13054-020-03023-0*
102. Moiana M., Aranda F., de Larrañaga G. A focus on the roles of histones in health and diseases. *Clin. Biochem., 2021, vol. 94, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2021.04.019*
103. Mokhtari V., Afsharian P., Shahhoseini M., Kalantar S.M., Moini A. A review on various uses of N-acetyl cysteine. *Cell J., 2017, vol. 19, no. 1, pp. 11–17. doi: 10.22074/cellj.2016.4872*
104. Narasaraju T., Tang B.M., Herrmann M., Muller S., Chow V.T.K., Radic M. Neutrophilia and NETopathy as key pathologic drivers of progressive lung impairment in patients with COVID-19. *Front. Pharmacol., 2020, vol. 11: 870. doi: 10.3389/fphar.2020.00870*
105. Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Joppich M., Hoffknecht M.L., Gold C., Engel A., Polewka V., Muenchhoff M., Hellmuth J.C., Ruhle A., Ledderose S., Weinberger T., Schulz H., Scherer C., Rudelius M., Zoller M., Keppler O.T., Zwißler B., von Bergwelt-Baildon M., Kääb S., Zimmer R., Bülow R.D., von Stillfried S., Boor P., Massberg S., Pekayvaz K., Stark K. Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia. *J. Thromb. Haemost., 2021, vol. 19, no. 2, pp. 574–581. doi: 10.1111/jth.15179*
106. Oehmcke S., Mörgelin M., Herwald H. Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun., 2009, vol. 1, no. 3, pp. 225–30. doi: 10.1159/000203700*
107. Ouwendijk W.J.D., Raadsen M.P., van Kampen J.J.A., Verdijk R.M., von der Thusen J.H., Guo L., Hoek R.A.S., van den Akker J.P.C., Endeman H., Langerak T., Molenkamp R., Gommers D., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Verjans G.M.G.M., Haagmans B.L. High levels of neutrophil extracellular traps persist in the lower respiratory tract of critically ill patients with coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis., 2021, vol. 223, no. 9, pp. 1512–1521. doi: 10.1093/infdis/jiab050*
108. Pacha O., Sallman M.A., Evans S.E. COVID-19: a case for inhibiting IL-17? *Nat. Rev. Immunol., 2020, vol. 20, no. 6, pp. 345–346. doi: 10.1038/s41577-020-0328-z*
109. Palmér R., Mäenpää J., Jauhiainen A., Larsson B., Mo J., Russell M., Root J., Prothon S., Chialda L., Forte P., Egelrud T., Stenvall K., Gardiner P. Dipeptidyl peptidase 1 inhibitor AZD7986 induces a sustained, exposure-dependent reduction in neutrophil elastase activity in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther., 2018, vol. 104, no. 6, pp. 1155–1164. doi: 10.1002/cpt.1053*

110. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol., 2018, vol. 18, no. 2, pp. 134–147. doi: 10.1038/nri.2017.105*
111. Pérez-Sánchez C., Ruiz-Limón P., Aguirre M.A., Jiménez-Gómez Y., Arias-de la Rosa I., Ábalos-Aguilera M.C., Rodriguez-Ariza A., Castro-Villegas M.C., Ortega-Castro R., Segui P., Martinez C., Gonzalez-Conejero R., Rodríguez-López S., Gonzalez-Reyes J.A., Villalba J.M., Collantes-Estévez E., Escudero A., Barbarroja N., López-Pedrera C. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in rheumatoid arthritis patients. *J. Autoimmun., 2017, vol. 82, pp. 31–40. doi: 10.1016/j.jaut.2017.04.007*
112. Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Dorward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J. Pathol., 2019, vol. 247, no. 5, pp. 672–685. doi: 10.1002/path.5221*
113. Qi H., Yang S., Zhang L. Neutrophil extracellular traps and endothelial dysfunction in atherosclerosis and thrombosis. *Front. Immunol., 2017, vol. 8: 928. doi: 10.3389/fimmu.2017.00928*
114. Risitano A.M., Mastellos D.C., Huber-Lang M., Yancopoulou D., Garlanda C., Ciceri F., Lambris J.D. Complement as a target in COVID-19? *Nat. Rev. Immunol., 2020, vol. 20, no. 6, pp. 343–344. doi: 10.1038/s41577-020-0320-7*
115. Ruiz-Limón P., Ortega R., Arias de la Rosa I., Abalos-Aguilera M.D.C., Perez-Sanchez C., Jimenez-Gomez Y., Peralbo-Santaella E., Font P., Ruiz-Vilches D., Ferrin G., Collantes-Estevez E., Escudero-Contreras A., López-Pedrera C., Barbarroja N. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl, Res., 2017, vol. 183, pp. 87–103. doi: 10.1016/j.trsl.2016.12.003*
116. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., Uehata T., Iwasaki H., Omori H., Yamaoka S., Yamamoto N., Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell. Host Microbe, 2012, vol. 12, no. 1, pp. 109–116. doi: 10.1016/j.chom.2012.05.015*
117. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol., 2016, vol. 19, pp. 7: 366. doi: 10.3389/fimmu.2016.00366*
118. Schreiber A., Rousselle A., Becker J.U., von Mässenhausen A., Linkermann A., Kettritz R. Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2017, vol. 114, no. 45, pp. E9618–E9625. doi: 10.1073/pnas.1708247114*
119. Schulman S., Harenberg J. Anticoagulant treatment of COVID-19 as early as possible-sulodexide and perspectives. *Thromb. Haemost., 2021, vol. 121, no. 7, pp. 849–853. doi: 10.1055/a-1477-3569*
120. Shaw R.J., Abrams S.T., Austin J., Taylor J.M., Lane S., Dutt T., Downey C., Du M., Turtle L., Baillie J.K., Openshaw P.J.M., Wang G., Semple M.G., Toh C.H. Circulating histones play a central role in COVID-19-associated coagulopathy and mortality. *Haematologica, 2021, vol. 106, no. 9, pp. 2493–2498. doi: 10.3324/haematol.2021.278492*
121. Shaw S., Bourne T., Meier C., Carrington B., Gelinas R., Henry A., Popplewell A., Adams R., Baker T., Rapecki S., Marshall D., Moore A., Neale H., Lawson A. Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling. *MAbs, 2014, vol. 6, no. 3, pp. 774–782. doi: 10.4161/mabs.28612*
122. Shi H., Gandhi A.A., Smith S.A., Wang Q., Chiang D., Yalavarthi S., Ali R.A., Liu C., Sule G., Tsou P.S., Zuo Y., Kanthi Y., Farkash E.A., Lin J.D., Morrissey J.H, Knight J.S. Endothelium-protective, histone-neutralizing properties of polyanionic agent defibrotide. *JCI Insight., 2021, vol. 6, no. 17: e149149. doi: 10.1172/jci.insight.149149*
123. Shi Y., Wang Y., Shao C., Huang J., Gan J., Huang X., Bucci E., Piacentini M., Ippolito G., Melino G. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell. Death Differ., 2020, vol. 27, no. 5, pp. 1451–1454. doi: 10.1038/s41418-020-0530-3*
124. Silk E., Zhao H., Weng H., Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell. Death Dis., 2017, vol. 8, no. 5: e2812. doi: 10.1038/cddis.2017.52*
125. Silvestre-Roig C., Braster Q., Wichapong K., Lee E.Y., Teulon J.M., Berrebeh N., Winter J., Adrover J.M., Santos G.S., Froese A., Lemnitzer P., Ortega-Gómez A., Chevre R., Marschner J., Schumski A., Winter C., Perez-Olivares L., Pan C., Paulin N., Schoufour T., Hartwig H., González-Ramos S., Kamp F., Megens R.T.A., Mowen K.A., Gunzer M., Maegdefessel L., Hackeng T., Lutgens E., Daemen M., von Blume J., Anders H.J., Nikolaev V.O., Pellequer J.L., Weber C., Hidalgo A., Nicolaes G.A.F., Wong G.C.L., Soehnlein O. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature, 2019, vol. 569, no. 7755, pp. 236–240. doi: 10.1038/s41586-019-1167-6*
126. Skendros P., Mitsios A., Chrysanthopoulou A., Mastellos D.C., Metallidis S., Rafailidis P., Ntinopoulou M., Sertaridou E., Tsironidou V., Tsigalou C., Tektonidou M., Konstantinidis T., Papagoras C., Mitroulis I., Germanidis G., Lambris J.D., Ritis K. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J. Clin. Invest., 2020, vol. 130, no. 11, pp. 6151–6157. doi: 10.1172/JCI141374*
127. Sollberger G., Choidas A., Burn G.L., Habenberger P., Di Lucrezia R., Kordes S., Menninger S., Eickhoff J., Nussbaumer P., Klebl B., Krüger R., Herzig A., Zychlinsky A. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol., 2018, vol. 3, no. 26: eaar6689. doi: 10.1126/sciimmunol.aar6689*
128. Soy M., Keser G., Atagündüz P., Tabak F., Atagündüz I., Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin. Rheumatol., 2020, vol. 39, no. 7, pp. 2085–2094. doi: 10.1007/s10067-020-05190-5*
129. Spyropoulos A.C., Bonaca M.P. Studying the coagulopathy of COVID-19. *Lancet, 2022, vol. 399, no. 10320, pp. 118–119. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01906-1*
130. Stark J.M., Colasurdo G.N. Lung defences: intrinsic, innate and adaptive. In: Chernick V., Boat T.F., Wilmott R.W., Bush A., editors. Kendig's disorders of the respiratory tract in children, vol. 7, 7th ed. *Philadelphia: W.B. Saunders, 2006, pp. 205–223. doi: 10.1016/B978-1-4377-1984-0.00007-3*
131. Stebbing J., Phelan A., Griffin I., Tucker C., Oechsle O., Smith D., Richardson P. COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments. *Lancet Infect. Dis., 2020, vol. 20, no. 4, pp. 400–402. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30132-8*

132. Tan M.K.X., Heng T.Y.J., Mak A. The potential use of metformin, dipyridamole, N-acetylcysteine and statins as adjunctive therapy for systemic lupus erythematosus. *Cells, 2019, vol. 8, no. 4: 323. doi: 10.3390/cells8040323*
133. Teijeira Á., Garasa S., Gato M., Alfaro C., Migueliz I., Cirella A., de Andrea C., Ochoa M.C., Otano I., Etxeberria I., Andueza M.P., Nieto C.P., Resano L., Azpilikueta A., Allegretti M., de Pizzol M., Ponz-Sarvisé M., Rouzaut A., Sanmamed M.F., Schalper K., Carleton M., Mellado M., Rodriguez-Ruiz M.E., Berraondo P., Perez-Gracia J.L., Melero I. CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity. *Immunity, 2020, vol. 52, no. 5, pp. 856–871.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.001*
134. Thålin C., Hisada Y., Lundström S., Mackman N., Wallén H. Neutrophil extracellular traps: villains and targets in arterial, venous, and cancer-associated thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2019, vol. 39, no. 9, pp. 1724–1738. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312463*
135. Thierry A.R., Roch B. Neutrophil extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med., 2020, vol. 9, no. 9: 2942. doi: 10.3390/jcm9092942*
136. Thierry A.R. Anti-protease treatments targeting plasmin(ogen) and neutrophil elastase may be beneficial in fighting COVID-19. *Physiol. Rev., 2020, vol. 100, no. 4, pp. 1597–1598. doi: 10.1152/physrev.00019.2020*
137. Thierry A.R. Does the newly observed inflammatory syndrome in children demonstrate a link between uncontrolled neutrophil extracellular traps formation and COVID-19. *Pediatr. Res., 2021, vol. 89, no. 4, pp. 716–717. doi: 10.1038/s41390-020-0996-1*
138. Todd C.M., Salter B.M., Murphy D.M., Watson R.M., Howie K.J., Milot J., Sadeh J., Boulet L.P., O'Byrne P.M., Gauvreau G.M. The effects of a CXCR1/CXCR2 antagonist on neutrophil migration in mild atopic asthmatic subjects. *Pulm. Pharmacol. Ther., 2016, vol. 41, pp. 34–39. doi: 10.1016/j.pupt.2016.09.005*
139. Twaddell S.H., Baines K.J., Grainge C., Gibson P.G. The emerging role of neutrophil extracellular traps in respiratory disease. *Chest, 2019, vol. 156, no. 4, pp. 774–782. doi: 10.1016/j.chest.2019.06.012*
140. Urban C.F., Nett J.E. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. In: Seminars in cell & developmental biology. *Academic Press, 2019, vol. 89, pp. 47–57. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.03.020*
141. Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol., 2006, vol. 8, no. 4, pp. 668–676. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x*
142. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis., 2020, vol. 1866, no. 5: 165664. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165664*
143. Wang J., Li Q., Yin Y., Zhang Y., Cao Y., Lin X., Huang L., Hoffmann D., Lu M., Qiu Y. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps in COVID-19. *Front. Immunol., 2020, vol. 11: 2063. doi: 10.3389/fimmu.2020.02063*
144. Wang Y., Luo L., Braun O.Ö., Westman J., Madhi R., Herwald H., Mörgelin M., Thorlacius H. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci. Rep., 2018, vol. 8, no. 1: 4020. doi: 10.1038/s41598-018-22156-5*
145. Warnatsch A., Ioannou M., Wang Q., Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science, 2015, vol. 349, no. 6245, pp. 316–320. doi: 10.1126/science.aaa8064*
146. Weber A.G., Chau A.S., Egeblad M., Barnes B.J., Janowitz T. Nebulized in-line endotracheal dornase alfa and albuterol administered to mechanically ventilated COVID-19 patients: a case series. *medRxiv [Preprint], 2020: 2020.05.13.20087734. doi: 10.1101/2020.05.13.20087734*
147. Winnersbach P., Rossaint J., Buhl E.M., Singh S., Lölsberg J., Wessling M., Rossaint R., Bleilevens C. Platelet count reduction during in vitro membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does not prevent clotting. *Perfusion, 2022, vol. 37, no. 2, pp. 134–143. doi: 10.1177/0267659121989231*
148. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L., Zhou X., Du C., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai C., Zheng J., Song Y. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med., 2020, vol. 180, no. 7, pp. 934–943. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994*
149. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., Taylor F.B., Esmon N.L., Lupu F., Esmon C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med., 2009, vol. 15, no. 11, pp. 1318–1321. doi: 10.1038/nm.2053*
150. Xu X., Han M., Li T., Sun W., Wang D., Fu B., Zhou Y., Zheng X., Yang Y., Li X., Zhang X., Pan A., Wei H. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2020, vol. 117, no. 20, pp. 10970–10975. doi: 10.1073/pnas.2005615117*
151. Yang S.C., Tsai Y.F., Pan Y.L., Hwang T.L. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. *Biomed J., 2021, vol. 44, no. 4, pp. 439–446. doi: 10.1016/j.bj.2020.09.001*
152. Yaqinuddin A., Kashir J. Novel therapeutic targets for SARS-CoV-2-induced acute lung injury: targeting a potential IL-1β/neutrophil extracellular traps feedback loop. *Med. Hypotheses, 2020, vol. 143: 109906. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109906*
153. Yu S., Liu J., Yan N. Endothelial dysfunction induced by extracellular neutrophil traps plays important role in the occurrence and treatment of extracellular neutrophil traps-related disease. *Int. J. Mol. Sci., 2022, vol. 23, no. 10: 5626. doi: 10.3390/ijms23105626*
154. Zhang H., Zhou P., Wei Y., Yue H., Wang Y., Hu M., Zhang S., Cao T., Yang C., Li M., Guo G., Chen X., Chen Y., Lei M., Liu H., Zhao J., Peng P., Wang C.Y., Du R. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann. Intern Med., 2020, vol. 172, no. 9, pp. 629–632. doi: 10.7326/M20-0533*
155. Zhang Y., Ding S., Li C., Wang Y., Chen Z., Wang Z. Effects of N-acetylcysteine treatment in acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Exp. Ther. Med., 2017, vol. 14, no. 4, pp. 2863–2868. doi: 10.3892/etm.2017.4891*

156. Zou X., Chen K., Zou J., Han P., Hao J., Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med., 2020, vol. 14, no. 2, pp. 185–192. doi: 10.1007/s11684-020-0754-0*
157. Zou Y., Chen X., Xiao J., Bo Zhou D., Xiao Lu X., Li W., Xie B., Kuang X., Chen Q. Neutrophil extracellular traps promote lipopolysaccharide-induced airway inflammation and mucus hypersecretion in mice. *Oncotarget, 2018, vol. 9, no. 17, pp. 13276–13286. doi: 10.18632/oncotarget.24022*
158. Zuo Y., Zuo M., Yalavarthi S., Gockman K., Madison J.A., Shi H., Woodard W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Knight J.S., Kanthi Y. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J. Thromb. Thrombolysis, 2021, vol. 51, no. 2, pp. 446–453. doi: 10.1007/s11239-020-02324-z*

Авторы:
Нестерова И.В., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, Россия; профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов МЗ РФ, Москва, Россия;
Атажахова М.Г., аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;
Тетерин Ю.В., аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;
Матушкина В.А., соискатель кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;
Чудилова Г.А., д.б.н., доцент, зав. отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия;
Митропанова М.Н., д.м.н., доцент, зав. кафедрой детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия.

Authors:
Nesterova I.V., DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation; Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;
Atazhakhova M.G., PhD Candidate, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation;
Teterin Yu.V., PhD Candidate, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation;
Matushkina V.A., PhD Candidate, Department of Infectious Diseases and Epidemiology of FAT and PRS, Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation;
Chudilova G.A., DSc (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation;
Mitropanova M.N., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Dentofacial Surgery, Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 31.10.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 29–36

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 29–36

ЧЕТВЕРТЫЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОММЕНТАРИЙ К COVID-19 (три года спустя). ДОВЕРИЕ И ВЕРА: СОЦИАЛЬНО-НРАВСТВЕННЫЙ СРЕЗ ВАКЦИНАЦИИ

О.И. Кубарь[1], Г.Л. Микиртичан[2]

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Подведение смысловых и системных итогов пандемии COVID-19 является актуальной задачей современной стратегии и должно составить очередную фазу прохождения и осмысления пандемии коронавирусной инфекции как эпидемической и гуманитарной катастрофы глобального характера. На страницах журнала «Инфекция и иммунитет» нами регулярно и последовательно были представлены данные этического взгляда на нормативно-правовой характер обеспечения планового и оперативного управления пандемией и рассмотрены проблемы административного регулирования системы общественного здравоохранения. Анализ и этическая оценка ситуации затрагивает обширный круг вопросов, включающий как базовый законодательный ресурс, так и тактическую адаптацию нормативного поля в условиях кризисной ситуации. Самостоятельного решения требовали нравственные и логистические вызовы в сфере оказания медицинской помощи, экстренного порядка разработки и производства средств диагностики, лечения и профилактики, а также всех аспектов, связанных с организацией и проведением вакцинации. Всем вышеобозначенным сюжетам были посвящены три предшествующих этических комментария, сделанные и представленные нами ранее в ходе пандемии коронавирусной инфекции в 2020–2022 гг. Современная работа, оформленная в рамках общей серии, как «четвертый этический комментарий» вытекает непосредственно из данных, полученных в процессе обработки и исследования актуального опыта проведения вакцинации в контексте регионального кластера — государств — участников Содружества независимых государств (СНГ), детально описанных в предыдущей статье. Осознанная необходимость и очевидная значимость данной работы состоит в регистрации объективных параметров уязвимости вакцинации при пандемии COVID-19, а также выявлении ответного спектра формирования соответственно доверия/недоверия к вакцинации в различных слоях общества, в зависимости от комплекса социальных и нравственных факторов, включающих принадлежность к определенной религиозной конфессии. Исследованные и представленные в настоящей статье материалы имеют первостепенное значение для поиска нравственных путей поддержки и стабилизации ответственного отношения к защите морального, социального и физического здоровья граждан в чрезвычайных ситуациях.

Ключевые слова: *уроки пандемии, уязвимость вакцинации, общественный ответ, вера и доверие, доверие и недоверие, спектр недоверия, нравственная позиция, социальная ответственность, профессиональный долг, персональный выбор, диалог с обществом.*

Адрес для переписки:
Кубарь Ольга Иосифовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-56.
E-mail: okubar@list.ru

Contacts:
Olga I. Kubar
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Тел.: +7 (812) 233-21-56.
E-mail: okubar@list.ru

Для цитирования:
Кубарь О.И., Микиртичан Г.Л. Четвертый этический комментарий к COVID-19 (три года спустя). Доверие и вера: социально-нравственный срез вакцинации // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 29–36. doi: 10.15789/2220-7619-TFE-2102

Citation:
Kubar O.I., Mikirtichan G.L. The fourth ethical comment towards COVID-19 (three years later). trust and faith: social and moral profile of vaccination // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.15789/2220-7619-TFE-2102

© Кубарь О.И., Микиртичан Г.Л., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TFE-2102

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

THE FOURTH ETHICAL COMMENT TOWARDS COVID-19 (three years later). TRUST AND FAITH: SOCIAL AND MORAL PROFILE OF VACCINATION

Kubar O.I.[a], Mikirtichan G.L.[b]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. The summarizing up the semantic and systemic results should comprise the next phase to provide insights into COVID-19 pandemic and consider it as a modern epidemic and humanitarian crisis on global level. The journal «Infection and Immunity» regularly and consistently present the results of ethically viewed legal framework of the pandemic and the administrative regulation of the public health system. Analysis and ethical assessment of the situation covers a wide range of issues, including the provision and operational adaptation of the regulatory framework, the problems of medical care, the processes and conditions for developing diagnostics, treatment and prevention, as well as all aspects related to the organization and implementing vaccination. Three previous ethical comments presented in 2020–2022 during the pandemic were devoted to these issues. Current study within the framework of the «fourth ethical commentary» follows directly from the data obtained while evaluating and analysing real-world experience on vaccination in the context of a regional cluster — the CIS member states, presented in the previous article. The perceived need and obvious significance of the study is to highlight objective factors of vulnerability in the vaccination during the COVID-19 pandemic and identify the response spectrum to form trust/or distrust to vaccination in various sectors of society, depending on a set of social and moral factors, including those coupled to a religious denomination. The data obtained are of paramount importance to find the moral ways to support and stabilize a responsible attitude with the aim to protect moral, social and physical health in emergency situations.

Key words: *pandemic lessons, vaccination vulnerability, public response, faith and trust, trust and mistrust, mistrust spectrum, moral position, social responsibility, professional duty, personal choice, dialogue with society.*

Современный этап пандемии COVID-19 со всей определенностью можно характеризовать как время изучать и извлекать уроки. В реальной действительности настоящего момента мы сталкиваемся с непредвиденным явлением, поскольку оценка и анализ пандемии качественно сосредоточились в основном на уровне системы здравоохранения. Безусловно, такая работа необходима, логична и оправданна во имя настоящего и будущего медицины. Однако с учетом чрезвычайного социального масштаба катастрофы становится очевидным, что для осознания ошибок и поиска истины необходимо постараться распутать клубок связей, систем и структур отнюдь не только медицинского плана, а включающий также всю многогранную палитру взаимодействий, присущих современной цивилизации и их надрыв или, скорее, разрыв, имевший место в период последней пандемии.

Такое понимание нисколько не претендует на попытку всестороннего и цельного рассмотрения проблемы пандемии в рамках данной статьи, скорее, наоборот, подчеркивает ее скромное целевое назначение: провести социально-нравственный срез ситуации, сложившейся при вакцинации против COVID-19, в строго определенном ключе — конфликта «доверия и веры».

Многолетний авторский опыт работы в области вакцинопрофилактики с четким этическим акцентом восприятия ее эффективности и проблем, позволяет выделить фактор «доверия» к вакцинации как необходимое условие ее проведения и успеха [25, 26].

При этом существует шкала формирования «доверия», где определяющим служит авторитет, ответственность и правовая целесообразность государственных/административных систем, организующих вакцинацию. Следует также учитывать ориентацию на мнение профессионального сообщества и нравственное воздействие социально избранных групп влияния, таких как религия, СМИ и др. При этом необходимо иметь в виду дуплексный понятийный характер «доверия», включающий сторону, обеспечивающую, и сторону, оказывающую доверие.

Объективные факторы уязвимости формирования доверия к вакцинации в условиях пандемии COVID-19

Рассматривая проблему в избранном нами аналитическом формате, прежде всего, важно оценить, существовала ли в период пандемии COVID-19 объективная вероятность достижения доверия. Ранее, в специальном исследовании, опубликованном в данном авторитетном журнале, был детально представлен весь ряд научных и нравственных параметров, учет и соблюдение которых однозначно обеспечивает достоверность платформы «доверия» [17]. В работе была четко констатирована лишь относительная состоятельность условий формирования доверия как на каждом конкретном этапе,

так и в рамках цельной концепции вакцинопрофилактики при COVID-19 на национальном, региональном и глобальном уровнях [17]. К критическим моментам, которые существовали на момент создания вакцин и на этапе их применения, можно отнести дефицит научных знаний в области эпидемиологии инфекции, в характере иммунологической защиты, научно-технологических принципов разработки, а также лимит данных по эффективности/безопасности и практической базы применения [2, 7, 21]. К этому объективному списку следует добавить соревновательный режим разработки вакцин, что сопровождалось как реальными фактами компромиссных решений, так и нерегулируемой дискредитацией вакцин конкурентов и огромным отрицательным информационным воздействием путем создания стереотипа недоверия и скептицизма [12, 18, 30, 31].

Дезориентация общества в отношении вакцин/вакцинации множилась некомпетентностью дискуссий, отсутствием убедительных опровержений ложных фактов, игнорированием принципов солидарности и равной доступности в мировом масштабе [18, 33, 36] Директивный аспект регулирования, предполагающий обязательность вакцинации, был замаскирован директивным характером социально-правовых ограничений, что также не способствовало популяризации компании вакцинации.

Таким образом, со стороны обеспечения факторов доверия имела место многокомпонентная качественная недоработка исследовательского, нравственного, административного, правового, информационного и социального индекса. К этому следует добавить, что под прессом очевидной уязвимости вакцинации особое значение стало иметь усиление позиции антивакцинального лобби и присоединение к нему представителей профессиональной медицинской среды [8, 32, 34].

В подобных обстоятельствах было сложно ожидать от общества как стороны, которая должна на деле оказать доверие, истинной приверженности к вакцинации [6, 29]. Однако в противовес всем указанным выше отрицательным воздействиям, именно на данном уровне взаимодействия вступают в силу главные моральные аргументы убеждения, такие как историческая значимость вакцинации как универсального инструмента управления эпидемической ситуацией [25, 28]. Добавочную неопровержимую ценность приобретает социальная, профессиональная и персональная ответственность всех участников вакцинального процесса и нормативно-нравственный аспект баланса интересов индивидуума и общества при чрезвычайных ситуациях.

Нравственный отклик общества в аспекте формирования доверия к вакцинации в условиях пандемии COVID-19

Общественные отношения, сложившиеся в процессе вакцинации против COVID-19, регулировались не только принципами биологической/эпидемической целесообразности, но и нормами этики и права. Необходимо отдать должное трем стимулирующим факторам, к которым относятся: общественный запрос на сдерживание пандемии, моральное ожидание, связанное с разработкой вакцин, и обеспеченность конституционно закрепленных нормативных действий. Механизм и приоритет защиты интересов общества как обязанности государства при чрезвычайных ситуациях, включающих пандемии, универсально прописан в соответствующих статьях конституций стран мира [10].

Специальное значение приобрело нравственное измерение, основанное на вековых традициях непреложной веры с учетом уникальных возможностей предотвращения или разрешения конфликта интересов у членов соответствующих религиозных общественных групп. Прежде чем представить сложившийся диапазон специфического влияния религиозной приверженности в масштабе анализируемой нами геополитической зоны ряда стран СНГ, следует неминуемо признать, что весь спектр полемической уязвимости вакцинации затронул непосредственно религиозные институты, что обострило существующие религиозные смущения и потребовало поиска дополнительных компромиссов.

Проведенный нами ранее целостный анализ и обзор проблемы отношения различных религиозных конфессий к вакцинации, выявил отсутствие принципиального запрета на прививки во всех религиях мира и констатировал признание их ценности для спасения жизней людей [27]. Часто повторяющиеся, якобы религиозные, причины отказа от вакцинации характеризуют лишь недостаточную осведомленность об истинных богословских взглядах основных религий на вопросы иммунизации. Подобная ситуация вновь была озвучена при пандемии COVID-19, которая остро поставила перед обществом вопросы, связанные с вакцинопрофилактикой и ее восприятием верующими. Данной теме было посвящено много публикаций, обзоров и высказываний в глобальной вакцинальной (антивакцинальной) полемике [8, 13, 35, 37].

Наше внимание в целом и в сфере религиозной направленности в частности по-прежнему занимал поиск ответов на вопросы, что вызвало рост недоверия и какие выводы следует сделать, для улучшения ситуации в будущем? Очевидно,

что раскрытие истоков недоверия и соответствующих мер стабилизации, успешно можно достичь лишь в условиях первичного анализа вакцинальной политики при COVID-19 в конкретном регионе наблюдения, в нашем случае, как было отмечено выше, — в странах СНГ [17].

Поскольку господствующие вероисповедания в пределах названного региона составляют христианство и ислам, прежде всего, следует учитывать тот факт, что при пандемии сработали классические уровни непринятия вакцинации, а именно отказ по факту халяльности вакцин (ислам) или использования клеток человеческого эмбриона (христианство) [25]. Конкретные ситуации в отдельных странах и конфессиональном аспекте складывались следующим образом.

В Русской православной церкви (РПЦ) священноначалие высказалось в пользу вакцинопрофилактики от COVID-19. Патриарх Московский и всея Руси Кирилл еще в марте 2020 г. сделал прививку от коронавирусной инфекции одним из российских препаратов [20]. 22 декабря 2021 г. Святейший Патриарх Московский и всея Руси Кирилл, выступая с докладом на ежегодном Епархиальном собрании духовенства города Москвы, коснулся темы вакцинации от коронавирусной инфекции, которая стала поводом для широкого обсуждения как среди верующих, так и в обществе в целом. Он в частности сказал: «Знаю, что многих волнует тема вакцинации от коронавирусной инфекции и что в среде духовенства и мирян, точно так же, как и во всем обществе, есть разногласия по этому поводу. Кто-то считает, что вакцинация должна быть обязательной для всех, кто-то — что она должна быть полностью добровольной. Кто-то и вовсе считает ее ненужной или даже неприемлемой» [9]. Далее он высказал убеждение, что «вакцинироваться или нет — это вовсе не вероучительный вопрос. Это вопрос сугубо медицинский, дело личного выбора и ответственности человека, его жизненного опыта... Даже если весь мир станет ареной сегрегации по иммунному признаку, Церковь должна оставаться свободной от такой сегрегации и принимать всех стремящихся ко Христу людей» [22].

Однако не все представители РПЦ были согласны с положительным отношением к вакцинации от коронавируса. Реакция консервативных духовенства и мирян РПЦ, так называемого «глубинного православия», по многим вопросам кардинально отличалась от виденья официального церковного руководства [4].

Взгляд православных врачей и философов по данному вопросу еще за два десятилетия до пандемии, в 2009 г., нашел отражение в фундаментальных заявлениях Церковно-общественного совета по биомедицинской этике Московского Патриархата [23]. В указанных документах недвусмысленно высказано отношение к вакцинации как к необходимой современной мере профилактики инфекционных заболеваний, отказ от которой может привести к тяжелым последствиям. Конкретно к ситуации по теме вакцинации от коронавируса была сформулирована достаточно взвешенная позиция. С одной стороны, было вновь подчеркнуто, что «Русская Православная Церковь последовательно придерживается принципов защиты свободы выбора человека в использовании или неиспользовании новых и быстро развивающихся технологий, в том числе в сфере медицины». Был освещен «исторический опыт Русской Православной Церкви, которая знает примеры активного участия священнослужителей в распространении практики вакцинации», благодаря которой многие известные в прошлом эпидемии сошли на нет.

Убедительная поддерживающая позиция была присуща Армянской апостольской церкви, которая определила свое отношение к вакцинации, отметив, что: «прививка от болезни не представляет духовной опасности для верующих, а в условиях пандемии, кроме личной свободы, необходимо думать и об ответственности перед обществом и не подвергать угрозе ни себя, ни окружающих» [11].

Митрополия Молдовы вначале пандемии скептически относилась к иммунизации и открыто выступала против возможности «обязательной вакцинации», несмотря на то, что подобная практика вакцинации не была предусмотрена уполномоченными государственными органами Молдовы [3, 19]. Позднее ситуация значительно улучшилась и служители церкви, в том числе и ранее несогласные и даже те, которые поддерживали распространяемые в социальных сетях страхи о вакцинах, вакцинировались сами и стали убеждать прихожан ответственно относиться к своему здоровью и к здоровью окружающих.

Среди мусульман региона, также в силу имевшего место дефицита профессионального информирования и обилия мифов о пандемии и вакцинации, «вакцинальная нерешительность общества» на конфессиональном уровне не избежала роста в начальный период проведения вакцинальной компании [14]. Позднéе повышение фактора доверия в процессе вакцинации стало следствием солидарного нравственного воздействия, основанного на достижении соразмерности адекватного и открытого диалога с обществом [24]. Чрезвычайно значимый вклад внесли результаты участия ряда стан Центральноазиатского регионального экономического сотрудничества (ЦАРЭС)

в социологическом проекте, направленном на определение основных позиций общественного мнения в отношении вакцинации от COVID-19 и, в частности, открывшем истинное значение вековых устоев веры в защите здоровья и жизни [1]. В рамках проекта ЦАРЭС принимали участия несколько стран, вошедших в формат нашего изучения политики вакцинации от COVID-19, такие как Азербайджан, Кыргызстан, Таджикистан и Узбекистан [17].

Данные опроса подтвердили, что важным элементом негативного отношения к вакцинации и отказа от нее по так называемой «личной причине», стала недостаточность информации о роли массовой вакцинации в улучшении эпидемиологической ситуации.

Иллюстрацией к пониманию этого явления должна стать шкала самых распространенных причин отказов от вакцинации, разработанная ВОЗ в 2019 г. Пропорциональная последовательность данной шкалы представлена следующим образом: «уверенность в том, что болезнь обойдет стороной», «недоступность вакцин», а также «недостаток доверия» [5]. Поскольку в ситуации COVID-19 баланс в сторону заражения был чрезвычайно высок и доступность вакцин в исследуемом регионе была обеспечена, это снимает возможность оперирования данными параметрами и однозначно определяет самым очевидным фактором отказа от вакцинации именно «недостаток доверия». Подобное состояние не случайно, поскольку в пандемию COVID-19 информационное поле находилось полностью под воздействием непрофессионального СМИ, несвободного от конфликта интересов. Ответным показателем, выявленным по результатам указанного социального опроса, стало то, что подавляющее большинство респондентов получало информацию о вакцинах из СМИ, а не от медицинских работников. Так, например, по данным указанного опроса ЦАРЭС, медицинские работники в качестве источника получения информации упоминаются лишь в 13,5% в Кыргызстане, в 20,7% — в Таджикистане и в 8,2% — в Узбекистане [1, с. 57 табл. 9].

Казус данной ситуации заключается в том, что в ходе этого же социологического исследования было установлено, что позитивное влияние на формирование доверия к вакцинации в зависимости от гендерного статуса респондента (мужчины/женщины), повсеместно принадлежит именно медицинскому персоналу, соответственно: 70,0%/75,7% — Кыргызстан; 73,8%/76,4% — Таджикистан и 82,0%/85,2% — Узбекистан [1, с. 94, табл. 46].

Следует с сожалением констатировать, что представленные показатели однозначно указывают на упущенную возможность создания корректной вакцинальной среды в силу чрезвычайной по интенсивности и вовлеченности в актуальный режим пандемии профильных медицинских структур с одновременным переходом информационного «рупора» в непрофессиональную и склонную к сенсациям и негативизму сферу [1, с. 57, табл. 9].

В подобной обстановке задействование всех факторов нравственной поддержки безусловно имело существенное значение. Прямую связь следования религиозным наставникам по рекомендации вакцинации в регионе стран ЦАРЭС отметили в зависимости от гендерного статуса респондента (мужчины/женщины) соответственно: 1,9%/1,9% — в Кыргызстане; 3,4%/2,4% — в Таджикистане; 0,8%/0,2% — в Узбекистане [1, с. 94, табл. 46]. Однако следует иметь в виду и непрямые характеристики нравственного воздействия религии, такие как традиционная ценность семьи, что определило наиболее частую мотивацию и приверженность женщин к вакцинации в странах мусульманского региона для защиты родных и близких. В целом фактор защиты семьи послужил основанием для вакцинопрофилактики у 73,6% участников опроса в Кыргызстане, 80,7% — в Таджикистане и 72,8% — в Узбекистане [1, с. 65].

Заключение

Все вышеуказанные положения последовательно подчеркивают неопровержимость концепции профессиональной и социальной ответственности всех сторон и зон влияния (законодательство, здравоохранение, религия, СМИ) для поддержки авторитета научно-медицинских мер защиты здоровья общества, что было детально прокомментировано нами ранее на различных этапах развития пандемии [15, 16, 17].

Особо позитивным примером может служить практика вакцинации, обеспечивающая объективное, профессиональное информирование населения, исключение необоснованной дезинформации за счет системы «обратной связи», оперативное мониторирование результатов вакцинации и их открытое обсуждение в экспертно-профильном медицинском аспекте.

В целом необходимо акцентировать внимание на том, что достижение гармонического доверия к вакцинации на принципах убежденности, осознанности, независимости и веры в научный и нравственный потенциал медицины требует совершенствования социальных норм регулирования отношения человека и общества, прежде всего в части повышения правовой, административной и информационной ответственности уполномоченных на то структур и укрепления моральных основ во всех сферах человеческого сообщества.

Список литературы/References

1. Анализ отношения общества к вакцинации от COVID-19 в отдельных странах ЦАРЭС. Аналитический отчет. Апрель 2021. 104 с. [Analysis of society's attitude to vaccination against COVID-19 in selected CAREC countries. Analytical report. April 2021. 104 p. *(In Russ.)*] *URL: https://www.carecinstitute.org/wp-content/uploads/2021/04/CAREC-Institute-vaccination-attitudes-report-RUS-22-Apr-2021.pdf*
2. Бочкаева З.В., Макаров В.В. Новые технологические подходы к созданию вакцин для профилактики COVID-19 // II Междунар. науч.-практ. конф. по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям (9–10 декабря 2021 г., Санкт-Петербург): сб. материалов / под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. Саратов: Амирит, 2021. С. 28–31. [Bochkaeva Z.V., Makarov V.V. New technological approaches to the creation of vaccines for the prevention of COVID-19 // II International Scientific and Practical Conference on countering new coronavirus infection and other infectious diseases, December 9–10, 2021, St. Petersburg: proceedings. Eds.: A.Yu. Popova, V.V. Kutyrev. *Saratov: Amirite, 2021. 28–31 pp. (In Russ.)*]
3. В Кишиневе проходит протест против обязательной вакцинации от коронавируса // NewsMaker. Дата публикации: 03.08.2021. [A protest against mandatory vaccination against coronavirus is taking place in Chisinau // NewsMaker. Publication date: 03.08.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://newsmaker.md/rus/novosti/v-kishineve-prohodit-protest-protiv-obyazatelnoy-vaktsinatsii-ot-koronavirusa-video (14.11.2022)*
4. В РПЦ расходятся во мнении по вопросу вакцинации от COVID-19. В вакцину не верит даже патриарх Кирилл // Рамблер. Дата публикации: 17.09.2020. [The ROC disagrees on the issue of vaccination against COVID-19. Even Patriarch Kirill does not believe in the vaccine // Rambler. Publication date: 17.09.2020. *(In Russ.)*] *URL: https://news.rambler.ru/other/44859192-v-rpts-rashodyatsya-vo-mnenii-po-voprosu-vaktsinatsii-ot-covid-19-v-vaktsinu-ne-verit-dazhe-patriarh-kirill (14.11.2022)*
5. ВОЗ. Десять проблем здравоохранения, над которыми ВОЗ будет работать в 2019 году. [WHO: ten threats to public health in 2019] *URL: https:// www.who.int|news-room|sportlight|ten –threats-to-global-health-in-2019 (14.11.2022)*
6. ВЦИОМ выяснил, как россияне относятся к вакцинации от COVID-19 // РИА Новости. Дата публикации: 10.06.2021. [VTSIOM found out how Russians feel about vaccination against COVID-19 // RIA Novosti. Publication date: 10.06.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://ria.ru/20210610/vtsiom-1736476723.html (14.11.2022)*
7. Гончарова В.Е. Этические вопросы проведения клинических исследований и вакцинации против COVID-19 // Медицинская этика. 2021. Т. 10, № 2. С. 35–40. [Goncharova V.E. Ethical issues of conducting clinical trials and vaccination against COVID-19. *Meditsinskaya etika = Medical Ethics, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 35–40. (In Russ.)*]
8. Горошко Н.В., Емельянова Е.К., Пацала С.В. Проблема ковид-антивакцинаторства: Россия на мировом фоне // Социальные аспекты здоровья населения. 2021. Т. 67, № 4. [Goroshko N.V., Emelyanova E.K., Patsala S.V. The problem of COVID-anti-vaccination: Russia on a global background. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya = Social Aspects of Population Health, 2021, vol. 67, no. 4. (In Russ.)*] *doi: 10.21045/2071-5021-2021-67-4-3*
9. Доклад Святейшего Патриарха Кирилла на Епархиальном собрании г. Москвы (22 декабря 2021 года). Report of His Holiness Patriarch Kirill at the Diocesan Meeting of Moscow (December 22, 2021). *URL: http://www.patriarchia.ru/db/text/5874415.html (14.11.2022)*
10. Дорошенко Е.Н. Конституционно-правовые основы ограничения прав человека в связи с пандемией новой коронавирусной инфекции // Актуальные проблемы российского права. 2020. Т. 15, № 12. С. 48–56. [Doroshenko E.N. Constitutional law foundations for the restriction of human rights in connection with the new COVID-19 pandemic. *Aktualnye problemy rossiyskogo prava = Actual Problems of Russian Law, 2020, vol. 15, no. 12, pp. 48–56. (In Russ.)*] *doi: 10.17803/1994-1471.2020.121.12.048-056*
11. Духовной опасности для верующих в вакцинации нет — Армянская Апостольская церковь // SPUTNIK Армения. Дата публикации: 12.11.2021. [There is no spiritual danger for believers in vaccination — Armenian Apostolic Church // SPUTNIK Armenia. Publication date: 12.11.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://ru.armeniasputnik.am/20211112/dukhovnoy-opasnosti-dlya-veruyuschikh-v-vaktsinatsii-net--armyanskaya-apostolskaya-tserkov-35296492.html (14.11.2022)*
12. Есть 6 вакцин: Sputnik V., Pfizer и другие. А какая лучше? — изучаем вместе: видеофайл // SPUTNIK Узбекистан. Дата публикации: 19.02.2021. [There are 6 vaccines: Sputnik V., Pfizer and others. And which one is better? — we study together: videofile // SPUTNIK Uzbekistan. Date of publication: 19.02.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://uz.sputniknews.ru/20210219/16044005.html*
13. Конгрегация Вероучения: Нота о нравственности использования некоторых вакцин против COVID-19. Рим, Управление Конгрегации вероучения, 21 декабря 2020 г. [Congregation of the Doctrine of the Faith. A note on the ethics of using some Covid-19 vaccines.» Rome, Office of the Congregation for the Doctrine of the Faith, December 21. *(In Russ.)*] *URL: https://www.vatican.va/roman_curia/congregations/cfaith/documents/rc_con_cfaith_doc_20201221_nota-vaccini-anticovid_en.html*
14. Коронавирусные ограничения и вакцинация граждан стали одними из ключевых тем в интервью председателя Духовного управления мусульман Российской Федерации Муфтия Шейха Равиля Гайнутдина для телеканала «Россия 24» 2021 // Совет муфтиев России. Дата публикации: 20 июля 2021. [Coronavirus restrictions and vaccination of citizens became one of the key topics in an interview with the chairman of the Spiritual Administration of Muslims of the Russian Federation Mufti Sheikh Ravil Gainutdin for the TV channel "Russia 24" 2021 // Council of Muftis of Russia. Date of publication: July 20, 2021. *(In Russ.)*] *URL: https://muslim.ru/articles/278/30656*
15. Кубарь О.И. Этический комментарий к COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 287–294. [Kubar O.I. Ethical comments on COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 287–294. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-ECO-1447*
16. Кубарь О.И., Бичурина М.А., Романенкова Н.И. Второй этический комментарий к COVID-19 (год спустя) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 17–24. [Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. Second ethical comments towards COVID-19 (one year later). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 17–24. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-SEC-1645*

17. Кубарь О.И., Микиртичан Г.Л., Владимирова Е.Ю., Таги-заде Т.Г., Мамедова Ф.М., Гаджиева У.К., Давтян С.А., Мавсисян Ф.М., Тилекеева У.М., Грамма Р.К., Насырова Ф.Ю., Тишкова Ф.Х., Мухамедова З.М., Атамурадова Ф.С. Третий этический комментарий к COVID-19 (два года спустя) — вакцинация, солидарность и доверие // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 222–238. [Kubar O.I., Mikirtichan G.L., Vladimirova E.Yu., Taghi-zade T.G., Mamedova F.M., Gadzhieva U.K., Davtyan S.A., Mavsisyan F.M., Tilekeeva U.M., Gramma R.K., Nasyrova F.Yu., Tishkova F.H., Muhamedova Z.M., Atamuradova F.S. The third ethical commentary to COVID-19 (two years later) — vaccination, solidarity, and trust. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 222–238. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-THC-1875*
18. Лескова И.В., Зязин С.Ю. Недоверие к вакцинации как информационный вброс // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2021. Т. 29, № 1. С. 37–40. [Leskova I. V., Zyazin S. Yu. The lack of confidence to vaccination as information planting. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine, 2021, vol. 29, no. 1, pp. 37–40. (In Russ.)*] *doi: 10.32687/0869-866X-2021-29-1-37-40*
19. Митрополия Молдовы: Вакцинация от нового типа коронавируса должна быть добровольной // NewsMaker. Дата публикации: 19.05.2020. [Archdiocese of Moldova: Vaccination against a new type of coronavirus should be voluntary // NewsMaker. Publication date: 03.08.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://newsmaker.md/rus/novosti/mitropoliya-moldovy-vaktsinatsiya-ot-novogo-tipa-koronavirusa-dolzhna-byt-dobrovolnoy (14.11.2022)*
20. Патриарх Кирилл привился одной из российских вакцин от COVID-19 // РИА Новости. Дата публикации: 13.04.2021. Patriarch Kirill was vaccinated with one of the Russian COVID-19 vaccines // RIA Novosti. Publication date: 13.04.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://ria.ru/20210413/patriarkh-1728130920.html (14.11.2022)*
21. Попова А.Ю., Тотолян А.А. Методология оценки популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 609–616. [Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 609–616. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770*
22. Святейший Патриарх Кирилл: Церковь должна оставаться свободной от сегрегации по иммунному признаку и принимать всех стремящихся ко Христу // Православие.ru. Дата публикации: 22.12.2021. [His Holiness Patriarch Kirill: The Church must remain free from segregation on the basis of immunity and accept all those who aspire to Christ // Pravoslavie.ru. Date of publication: 22.12.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://pravoslavie.ru/143567.html (14.11.2022)*
23. Совместное заявление Совета и Общества православных врачей России о проблемах вакцинации в России // Русская православная церковь. Официальный сайт Московского Патриархата. Дата публикации: 25.05.2009. [Joint statement of the Council and the Society of Orthodox Doctors of Russia on the problems of vaccination in Russia // Russian Orthodox Church. Official site of the Moscow Patriarchate. Date of publication: 25.05.2009. Date of publication: 25.05.2009. *(In Russ.)*] *URL: http://www.patriarchia.ru/db/text/964218.html (14.11.2022)*
24. Фетва Совета Улемов Духовного собрания мусульман России по предотвращению распространения коронавирусной инфекции (COVID-19) (№ 07/21-СУ от 15 июля 2021 года). [Fatwa of the Ulema Council of the Spiritual Assembly of Muslims of Russia on preventing the spread of coronavirus infection (COVID-19) (N 07/21-SU dated July 15, 2021). *(In Russ.)*] *URL: https://dsmr.ru/islam/fetvy.html (14.11.2022)*
25. Этика вакцинации (критерий научного и гуманитарного прорыва). Под общей ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. 176 с. [Ethics of vaccination (criterion of scientific and humanitarian breakthrough). Ed. O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2018. 176 p. (In Russ.)*]
26. Этика инфекционной патологии. Под ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. 116 с. [Ethics of infectious pathology. Ed. O.I. Kubar. *St. Petersburg: Pasteur Research Institute, 2014. 116 p. (In Russ.)*]
27. Pelčić G., Karačić S., Микиртичан Г.Л., Кубарь О.И., Leavitt F. J., Cheng-tek Tai M., Morishita N., Vuletić S., Tomašević L. Религиозные возражения для вакцинации или религиозные оправдания для уклонения от вакцинации: действительно ли они существуют? Медицина и организация здравоохранения. 2020. Т. 5, № 1. С. 58–78. [Pelčić G., Karačić S., Mikirtichan G.L., Kubar O.I., Leavitt F.J., Cheng-tek Tai M., Morishita N., Vuletić S., Tomašević L. Religious objections to vaccination or religious justifications to refuse vaccination: is it really true? *Meditsina i organizatsiya zdravookhrane niya = Medicine and Healthcare Organization, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 58–78. (In Russ.)]*
28. Calabro G.E., Carini E., Tognetto A., Giacchetta I., Bonanno E., Mariani M., Ricciardi W., de Waure C. The Value(s) of vaccination: building the scientific evidence according to a value-based healthcare approach. *Front. Public Health, 2022, no. 10: 786662. doi: 10.3389/fpubh.2022.786662*
29. Fridman A., Gershon R., Gneezy A. COVID-19 and vaccine hesitancy: a longitudinal study. *PLoS One, 2021, no. 16: e0250123. doi: 10.1371/journal.pone.0250123*
30. Grüner S., Krüger F. The intention to be vaccinated against COVID-19: Stated preferences before vaccines were available. *Appl. Econ. Letters, 2021, vol. 28. no 21. pp. 1847–1851. doi: 10.1080/13504851.2020.1854445*
31. Hwang Y., Jeong S.-H. Misinformation exposure and acceptance: the role of information seeking and processing. *Health Commun., 2023, vol. 38, no. 3, pp. 585–593. doi: 10.1080/10410236.2021.1964187*
32. Kata A. A postmodern Pandora's box: anti-vaccination misinformation on the Internet. *Vaccine, 2010, vol. 28, no. 7, pp. 1709–1716. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.12.022*
33. Lawes-Wickwar S., Ghio D., Tang M.Y., Keyworth C., Stanescu S., Westbrook J., Jenkinson E., Kassianos A.P., Scanlan D., Garnett N., Laidlaw L., Howlett N., Carr N., Stanulewicz N., Guest E., Watson D., Sutherland L., Byrne-Davis L., Chater A., Hart J., Armitage C.J., Shorter G.W., Swanson V., Epton T. A rapid systematic review of public responses to health messages encouraging vaccination against infectious diseases in a pandemic or epidemic. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 9, no. 2: 72. doi: 10.3390/vaccines9020072*
34. Maroiu C., Rusu A., Pap Z. I think i should get vaccinated, i feel i should not. individual differences in information processing and vaccination behavior (COVID-19). *Healthcare (Basel), 2022, vol. 10, no. 7: 1302. doi: 10.3390/healthcare10071302*

35. Martel C., Pennycook G., Rand D.G. Reliance on emotion promotes belief in fake news. *Cogn. Res. Princ. Implic., 2020, vol. 5, no. 1: 47. doi: 10.1186/s41235-020-00252-3*
36. Okuhara T., Ishikawa H., Okada H., Ueno H., Kiuchi T. Dual-process theories to counter the anti-vaccination movement. *Prev. Med. Rep., 2020, vol. 20: 101205. doi: 10.1016/j.pmedr.2020.101205*
37. Paul E., Steptoe A., Fancourt D. Attitudes towards vaccines and intention to vaccinate against COVID-19: Implications for public health communications. *Lancet Reg. Health Eur., 2021, vol. 1: 100012. doi: 10.1016/j.lanepe.2020.100012*

Авторы:
Кубарь О.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; член Российского комитета по биоэтике (РКБ) при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО МИД РФ, Москва, Россия; экс-член Международного комитета по биоэтике (МКБ) ЮНЕСКО;
Микиртичан Г.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гуманитарных дисциплин и биоэтики ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Kubar O.I., DSc (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Member of the Russian Committee on Bioethics (RCB) at the Russian Federation Commission for UNESCO of the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russia; ex-member of the International Committee on Bioethics (IBC) UNESCO;
Mikirtichan G.L., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Humanitarian Disciplines and Bioethics, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.12.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 17.12.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 37–45

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 37–45

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В 2020–2022 гг., В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК МЫШЕЙ

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

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

Резюме. *Введение.* Быстрое распространение новой коронавирусной инфекции среди населения многих стран мира способствовало генетической эволюции вируса, следствием чего явилось появление множества генетических вариантов коронавируса SARS-CoV-2. Мутации в вирусном геноме могут влиять на способность вируса обходить иммунную защиту и затруднять разработку диагностических и профилактических препаратов. Данные о нейтрализующей активности сывороток, полученных против циркулировавших ранее генетических вариантов вируса, в отношении актуальных штаммов SARS-CoV-2, могут служить научным обоснованием для выбора антигенов при разработке вакцин. Целью работы явилось изучение кросс-реактивности штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим вариантам, которые были выделены на территории Российской Федерации в период 2020–2022 гг. в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей. *Материалы и методы.* Использованы 10 штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим вариантам (3 штамма, не являющиеся VOC, альфа, бета, гамма, дельта, дельта+AY, омикрон 1 и омикрон 2). Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань) был включен в исследование в качестве прототипного варианта. Мышей линии BALBc иммунизировали инактивированным концентрированным антигеном в смеси с адъювантом 1:1, в качестве которого использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы на основе сапонинов Квиллайи мыльной *(Quillaja saponaria).* Титр антител определяли в реакции нейтрализации. *Результаты.* Показано значительное снижение нейтрализующей способности антител, специфичных к генетическим вариантам коронавируса SARS-CoV-2 не относящимся к VOC, против бета VOC и, в меньшей степени, против альфа и гамма VOC. Различия уровня нейтрализующей активности антител для альфа и бета VOC между собой незначительны, с вариантом гамма VOC — не достоверны. Нейтрализующая способность антител, специфичных к дельта VOC, против вариантов альфа и бета VOC снижена в 4 раза. Нейтрализующая активность сывороток, полученных к вариантам омикрон 1 и 2, по отношению к прототипному варианту коронавируса снижена в 18 раз, к гамма-варианту — в 12 раз, к дель-

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

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

Для цитирования:
Зайковская А.В., Евсеенко В.А., Олькин С.Е., Пьянков О.В. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ в 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 37–45. doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998

Citation:
Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V. Investigating antigenic features of the SARS-CoV-2 isolated in Russian Federation in 2021–2022 by hyperimmune mouse serum neutralisation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 37–45. doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998

© Зайковская А.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IAF-1998

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

та-вариантам — более чем в 30 раз, для остальных вариантов она еще ниже. *Выводы.* Полученные результаты свидетельствуют о наличии кросс-реактивности между штаммами коронавируса, относящимися к генетическим линиям Ухань, альфа, бета, гамма; для дельта-вариантов она слабее. Мутации в геноме вариантов омикрон VOC привели к значимому снижению антигенных перекрестов с более ранними генетическими вариантами коронавируса. Эти сведения объясняют низкую эффективность вакцин, созданных на основе генетического варианта вируса, циркулировавшего в первые недели пандемии, синтетических иммуногенов и рекомбинантных белков на его основе против вариантов омикрон VOC, которые вызвали подъем заболеваемости с начала 2022 г., а также случаи повторного заболевания людей при инфицировании новыми генетическим вариантов коронавируса.

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

INVESTIGATING ANTIGENIC FEATURES OF THE SARS-CoV-2 ISOLATED IN RUSSIAN FEDERATION IN 2021–2022 BY HYPERIMMUNE MOUSE SERUM NEUTRALISATION

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

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* The rapid spread of a new coronavirus infection among populations in many countries worldwide has contributed to the genetic evolution of the virus, resulting in the emergence of multiple genetic variants of the SARS-CoV-2 coronavirus. Mutations in the viral genome can affect the ability of the virus to bypass the immune system and complicate development of diagnostic and prophylactic drugs. Data on the neutralizing activity of the sera obtained against previously circulating genetic variants of the virus in relation to current SARS-CoV-2 strains may serve as a scientific basis for the selection of the antigens in vaccine development. The aim of this work was to study cross-reactivity of SARS-CoV-2 coronavirus strains belonging to different genetic variants, which were isolated in the territory of the Russian Federation during 2020–2022 in the neutralization reaction using mouse hyperimmune sera. *Materials and methods.* Ten strains of SARS-CoV-2 coronavirus belonging to different genetic variants were used (three non-VOC strains, alpha, beta, gamma, delta, delta+AY, omicron 1 and omicron 2). The hCoV-19/Australia/VIC01/2020 strain (Wuhan) was included in the study as a prototypical variant. BALBc mice were immunized with inactivated concentrated antigen mixed with a 1:1 adjuvant, which was a virus-like immunostimulatory complex based on Quillaja saponaria (Quillaja saponaria). The antibody titer was determined in the neutralization reaction. *Results.* Essential decrease of neutralizing ability of antibodies specific to non-vOC genetic variants of SARS-CoV-2 coronavirus was revealed against beta VOC and to a lesser degree against alpha and gamma VOC variants. The differences in the neutralizing activity level of antibodies for alpha and beta VOC variants are not significant among themselves, and with gamma VOC variants — there are no significant differences. Neutralizing ability of antibodies specific to delta VOC against alpha and beta VOC variants decreased 4-fold. Neutralizing activity of sera obtained to omicron 1 and 2 variants in relation to the prototype coronavirus variant was reduced 18-fold, to the gamma variant — 12-fold, to delta variants — more than 30-fold; for other variants it was even lower. *Conclusions.* The results obtained testify to the presence of cross-reactivity between strains of coronavirus belonging to genetic lines Wuhan, alpha, beta, gamma; it is weaker for delta variants. Mutations in the genome of VOC omicron variants led to a significant decrease in antigenic cross-links with earlier genetic variants of the coronavirus. These findings explain the low efficacy of vaccines based on the Wuhan strain, synthetic immunogens, and recombinant proteins based on it against omicron VOC variants, which have caused a rise in morbidity since early 2022, as well as cases of re-infection of humans with new genetic variants of the coronavirus.

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

Введение

Быстрое распространение новой коронавирусной инфекции среди населения многих стран мира способствовало генетической эволюции вируса, следствием чего явилось появление множества генетических вариантов коронавируса SARS-CoV-2. Мутации в вирусном геноме могут влиять на способность вируса обходить иммунную систему и затруднять разработку диагностических и профилактических препаратов [12]. В настоящее время Всемирная организация здравоохранения выделяет пять основных генетических вариантов, вызывающих обеспокоенность (VOC, Variant of Concern): Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron [2].

Было установлено, что иммунодоминантным белком-мишенью коронавируса SARS-CoV-2 является поверхностный гликопротеин S, который в форме тримера выполняет функции связывания с рецептором клеток и слияния оболочек вирусного капсида и клетки-мишени [6]. В поверхностном гликопротеине S вириона SARS-CoV-2 рецептор-связывающий домен

(RBD) содержит 11 из 14 эпитопов, ответственных за связь с вируснейтрализующими антителами [6, 9]. Данные другого исследования, представленного Harvey W.T. и соавт., свидетельствуют о том, что около 90% нейтрализующих антител связываются с RBD-доменом [7].

При циркуляции в человеческой популяции под давлением иммунитета происходит отбор вариантов вируса, способных уклоняться от нейтрализующих факторов и при этом сохранять репродуктивный потенциал. Эти варианты и характеризующие их мутации генома детально описаны в молекулярно-генетических исследованиях, однако они не позволяют сделать вывод о формировании эскейп-мутантов или нейтральности тех или иных аминокислотных замен [10].

Совокупность научных данных свидетельствует о том, что вакцины, созданные на основе штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных в первые недели пандемии, постепенно утрачивают эффективность в отношении циркулирующих в настоящий период вариантов [5]. Данные о нейтрализующей активности сывороток, полученных против циркулировавших ранее генетических вариантов вируса, в отношении актуальных штаммов SARS-CoV-2 могут служить научным обоснованием для выбора антигена при разработке вакцин. Так, например, анализ кросс-реактивности сывороток в серологических реакциях применяется на протяжении десятилетий для выбора вакцинных штаммов противогриппозных вакцин и подтвердил свою эффективность [15].

Целью работы явилось изучение кросс-реактивности штаммов коронавируса SARS-CoV-2, относящихся к разным генетическим вариантам, которые были выделены на территории РФ в период 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей.

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали культуру клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клетки культивировали при 37°С в питательной среде DMEM («Gibco», Thermo Fisher Scientific, США) с L-глутамином, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», Thermo Fisher Scientific, США), Antibiotic-Antimycotic («Gibco», Thermo Fisher Scientific, США) в атмосфере с 5% CO_2.

Вирусы. Эксперименты с инфекционным материалом были проведены в лаборатории, соответствующей уровню биобезопасности BSL-3 во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, имеющем СЭЗ на право проведения работ с особо опасными вирусами. В работе использовали штаммы коронавируса SARS-CoV-2, депонированные в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» Роспотребнадзора, которые были выделены от больных людей на территории РФ. В качестве прототипного варианта использовали Штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань), который был любезно предоставлен Mike Catton (Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Melbourn, Australia) в феврале 2020 г. Для получения панели гипериммуннных сывороток были использованы штаммы, относящиеся к разным генетическим линиям коронавируса SARS-CoV-2. Сведения о генетических характеристиках, инфекционных титрах штаммов представлены в табл. 1. Штаммы вирусов были наработаны на культуре клеток Vero E6, для проведения реакции нейтрализации были приготовлены аликвоты, которые хранили при –80°С. Для каждого пула вируса были определены инфекционные титры.

Определение инфекционного титра вируса. Культуру клеток выращивали в 96-ти луночном культуральном планшете. После удаления ростовой среды из лунок культурального планшета в них вносили последовательные десятикратные разведения вируссодержащей жидкости в поддерживающей среде не менее чем в трех повторах. Планшеты инкубировали в течение 4 суток, результат учитывали визуально по наличию ЦПД после окрашивания раствором генцианвиолета. Для окрашивания клеток в каждую лунку планшета вносили по 0,1 мл 0,2% раствора генцианвиолета (1 г генцианвиолета растворяли в 20 мл 96% этилового спирта, добавляли 120 мл 40% формалина и 350 мл раствора Хенкса). Через 30 мин жидкость из лунок удаляли и планшеты промывали водопроводной водой. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как ЦПД. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида–Менча и выражали в lg $ТЦД_{50}$/мл [11].

Подготовка антигенов. Пулы штаммов вируса были наработаны на культуре клеток Vero E6, трехкратно заморожены и размороженны, затем центрифугированы при 4 тыс. об/мин в течение 10 мин, фильтрованы через фильтрующие насадки (0,22 Merck, Millipore), концентрированы при помощи центрифужных концентраторов (50 kDa, Amicon Ultra-15, Merck, Millipore), согласно инструкции производителя. По объему вирусные суспензии были сконцентрированы в 20 раз. На каждом этапе подготовки антигена определяли титр инфекционного вируса (табл. 1). Полученную концентрированную фракцию инактивировали бета-пропиолактоном (BPL) (Acros Organics). Конечная

Таблица 1. Информация о штаммах коронавируса SARS-CoV-2, использованных для иммунизации животных

Table 1. Data on SARS-CoV-2 coronavirus strains, used for animals' immunization

Сокращение названия штамма Abbreviations of the strain name	Название штамма, (GISAID ID), обозначение штамма согласно ВОЗ, генетическая линия Name of the strain, (GISAID ID), WHO label variants of concern VOC, genetic lineage	Инфекционный титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл) Infectious virus titers (lg TCD_{50}/ml)	
		исходный титр Initial virus titer	концентрированная фракция concentrated fraction
Ухань Wuhan	**hCoV-19/Australia/VIC01/2020, (EPI_ISL_406844), –, B**	7,0±0,29	8,5±0,35
Russia/Omsk	**hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020, (EPI_ISL_1242008), –, B1.1**	7,25±0,38	8,17±0,33
Russia/SPE	**hCoV-19/Russia/SPE-57701/2020, (EPI_ISL_6565013), –, B1.1**	7,0±0,29	8,5±0,0
Альфа Alfa	**hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020, (EPI_ISL_6565012), Alfa, B1.1.7**	6,75±0,25	8,5±0,0
Бета Beta	**hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021, (EPI_ISL_6492245), Beta, B1.351**	6,75±0,25	6,83±0,33
Гамма Gamma	**hCoV-19/Russia/SA-17620–080521/2021, (EPI_ISL_6565014), Gamma, P1**	6,5±0,35	7,25±0,25
Дельта Delta	**hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021, (EPI_ISL_7338814), Delta, B1.617.2**	6,5±0,0	7,0±0,29
Дельта+AY Delta+AY	**hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021, (EPI_ISL_7338789), Delta, B.1.617.2+AY.**	6,75±0,25	7,25±0,38
Омикрон 1 Omicron 1	**hCoV-19/Russia/Moscow171619–031221/2021, (EPI_ISL_8920444), Omicron 1, BA.1**	7,25±0,25	8,25±0,38
Омикрон 2 Omicron 2	**hCoV-19/Russia/Amursk-1603/2022, (EPI_ISL_12809000), Omicron 2, BA.2**	7,0±0,29	8,0±0,29

Примечание. Значения указаны в виде среднего значения ± стандартное отклонение.
Note. Values are indicated as mean value ± standard deviation.

концентрация BPL в растворе составила 0,1%. Процедуру инактивации вируссодержащей жидкости проводили согласно инструкции производителя. Остаточную инфекционность инактивированных фракций проверяли путем инфицирования культуры клеток Vero E6. Остаточная инфекционность отсутствовала для всех образцов.

Получение мышиных гипериммунных сывороток. Для иммунизации были использованы мыши линии BALBc массой 18–20 г (Питомник лабораторных животных, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), по 4–10 животных в каждой группе. Инактивированный антиген вводили животным внутримышечно двукратно с интервалом 3 недели по 0,1 мл/животное в смеси с адъювантом 1:1. В качестве адъюванта использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы (ИСКОМ) на основе сапонинов Квиллайи мыльной *(Quillaja saponaria)* в концентрации 160 мкг/мл [1].

Содержание сапонинов Квиллайи мыльной в ИСКОМ-адъюванте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu) с диодно-матричным детектором SPD M20A и колонкой Kromasil 300-5-C4 (4,6 mm id × 150 mm). Объем анализируемой пробы — 50 мкл. Подвижная фаза А: 95% воды деионизованной, 5% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Подвижная фаза В: 5% воды деионизованной, 95% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Линейный градиент: увеличение содержания подвижной фазы В с 20 до 65% за время от 0 мин до 30 мин с последующим выдерживанием 65% уровня В — до 35 мин. Скорость подвижной фазы — 0,5 мл/мин, детектирование — 215 нм. В качестве образца сравнения использовали сухой препарат Saponin from Quillaja Bark pure (PanReac, Code — A2542).

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

Реакция нейтрализации. Культуру клеток Vero E6 выращивали в 96-ти луночном культуральном планшете. Исследуемые сыворотки прогревали при +56°С в течение 30 мин, затем готовили последовательные двукратные раз-

ведения, начиная с разведения 1:10. Для разведения сывороток использовали среду ДМЕМ с глутамином и добавлением антибиотиков. Готовили рабочую концентрацию вируса с титром 2 × 3 lg $ЦПД_{50}$/0,1мл. Готовили смесь разведений сыворотки и рабочего разведения вируса в равных объемах. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли в лунки 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero E6 и инкубировали в течение 4 дней при 37°C, 5% CO_2. Результат учитывали визуально по наличию ЦПД после окрашивания раствором генцианвиолета. Любое специфическое повреждение клеточной культуры в лунке считали цитопатическим эффектом (ЦПД). При постановке реакции нейтрализации были предусмотрены следующие контроли: контроль клеток (КК) — лунки не инфицированные вирусом, отрицательный контрольный образец сыворотки мышей (К–) в разведении 1/10, контроль вируса (КВ) — лунки инфицированные рабочим разведением вируса разведенным в 2 раза, контроль рабочей концентрации вируса — готовили два последовательных десятикратных разведения рабочей концентрации вируса (КВ/10, КВ/100). Титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не регистрировали. Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК — клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранен полностью, К–, КВ и КВ/10 — полная дегенерация монослоя клеток, КВ/100 — половина инфицированных лунок имеет признаки ЦПД.

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

Результаты

Были получены мышиные гипериммунные сыворотки к 9 штаммам коронавируса SARS-CoV-2, выделенным на территории РФ в период 2020–2022 гг. и к референс-штамму hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань), исследована их кросс-реактивность. Результаты реакции нейтрализации гипериммунных сывороток мышей, полученных к различным генетическим вариантам коронавируса SARS-CoV-2, в отношении к вирусным штаммам, использованным для получения этих сывороток представлены в табл. 2.

При подготовке антигенов кратность концентрирования вируса контролировали по изменению его инфекционного титра. На основании сведений, представленных в табл. 1, можно сказать, что концентрация исходных пулов вирусов была практически одинаковой. Среднее значение для титра пулов вируса составило 6,88±0,27 lg $ТЦД_{50}$/мл. При использованном методе подготовки антигена вирус был сконцентрирован в 20 раз по объему, при этом инфекционный титр увеличился в среднем на 0,95±0,40 lg $ТЦД_{50}$/мл, потери после центрифугирования и фильтрования составили 0,23±0,09 lg $ТЦД_{50}$/мл, потери после использования концентраторов составили 0,62±0,68 lg $ТЦД_{50}$/мл. Остаточной инфекционности концентрированных фракций после инактивации бета-пропиолактоном не обнаружено. Антигены были приготовлены одним методом, исходя из вышеприведенных данных можно предположить, что использованные для иммунизации животных концентрации антигенов не имели существенных различий.

В качестве адъюванта использовали вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы на основе сапонинов. Сапонинсодержащие адъюванты стимулируют врожденный и адаптивный клеточный иммунитет, а также гуморальный ответ всех изотипов IgG. Первоначально для иммунизации животных той же дозой антигена в качестве адъюванта использовали адъювант Фрейнда (данные в статье не приводятся), при этом титры антител были в среднем в 8 раз ниже, что не позволило полноценно оценить кросс-реактивность.

В период первого подъема заболеваемости коронавирусом в РФ циркулировали штаммы, не являющиеся VOC. В работе были использованы три штамма этой генетической группы: референс-штамм Ухань, штамм Russia/Omsk, который был выделен от больного человека в Сибирском регионе, и штамм Russia/SPE, являющийся завозным случаем в Россию из Италии. По антигенным свойствам они являются очень схожими. На основании результатов, представленных в табл. 2, можно сказать, что достоверных отличий нейтрализующей активности сывороток, специфичных к вирусам Ухань и Russia/Omsk по отношению к штаммам этой же группы вирусов не выявлено. Можно предположить, что штамм Russia/SPE является наиболее иммуногенным штаммом из этой группы вирусов (среднее значение титров антител с гомологичным штаммом превышает 1:1000). Выявлено достоверное снижение ней-

Таблица 2. Результаты реакции нейтрализации различных генетических вариантов коронавируса SARS-CoV-2 гипериммунными сыворотками мышей, полученными к этим же штаммам вируса

Table 2. The results of the neutralization test different genetic variants of the coronavirus SARS-CoV-2 with hyperimmune mice sera, obtained to these virus strains

Штамм вируса, к которому были получены гипеиммунные сыворотки Virus strain for obtained hyperimmune serums	**Штамм вируса, использованный в реакции нейтрализации** Virus strains used in neutralization test									
	Ухань Wuhan	**Russia/ Omsk**	**Russia/SPE**	**Альфа** Alfa	**Бета** Beta	**Гамма** Gamma	**Дельта** Delta	**Дельта +AY** Delta+AY	**Омикрон 1** Omicron 1	**Омикрон 2** Omicron 2
Ухань/Wuhan	202 (160–320)	160 (80–320)	202 (160–320)	160 (160–160)	160 (160–160)	254 (160–320)	50* (40–80)	64* (40–80)	32* (20–40)	40* (20–80)
Russia/Omsk	160 (80–320)	269 (160–320)	226 (160–320)	160 (160–160)	57* (40–80)	135 (80–320)	80* (40–160)	80* (40–160)	10* (5–20)	28* (20–40)
Russia/SPE	226* (160–640)	229* (160–320)	1076 (1280–640)	229* (80–640)	67* (40–160)	381 (1280–160)	160* (80–320)	190* (320–80)	40* (40–40)	48* (40–80)
Альфа/Alfa	160* (160–160)	243 (160–320)	160* (160–160)	320 (320–320)	184* (160–320)	368 (320–640)	46* (20–80)	80* (40–160)	35* (20–80)	40* (20–80)
Бета/Beta	145* (80–320)	131* (80–320)	119* (80–160)	131* (80–160)	390 (160–640)	476 (640–320)	33* (20–80)	44* (20–80)	33* (20–80)	49* (20–80)
Гамма/Gamma	640 (1280–320)	453* (160–640)	640 (230–1280)	640 (320–1280)	718 (320–2560)	1280 (320–1280)	113* (80–160)	180* (80–320)	160* (40–320)	90* (40–160)
Дельта/Delta	101* (80–160)	101* (40–160)	123* (80–320)	63* (40–80)	63 (40–160)	202 (80–640)	254 (160–320)	254 (160–320)	63* (40–80)	80* (40–160)
Дельта+AY/Delta+AY	285 (160–640)	101* (40–160)	285 (160–640)	226 (160–320)	160 (40–640)	143 (40–640)	320 (160–640)	403 (160–1280)	28* (10–160)	71* (20–320)
Омикрон 1/Omicron 1	80* (40–160)	25* (20–80)	50* (40–80)	10* (5–40)	36* (10–80)	127* (80–320)	45* (20–160)	16* (10–40)	1437 (640–5120)	180* (80–320)
Омикрон 2/Omicron 2	20* (5–40)	6* (5–10)	35* (20–80)	6* (5–10)	7* (5–10)	29* (10–80)	10* (5–20)	7* (5–20)	58* (20–160)	368 (160–1280)

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

Note. Values as the geometric mean of the reverse titers of sera (the lowest value is the highest value). Titers below 10 are taken as 5. The result with the homologous antigen highlighted in gray. * — statistical significance at $p < 0.05$, analysis performed using Mann–Whitney U-test.

трализующей способности антител специфичных к вирусу Russia/Omsk против варианта бета VOC. Антитела специфичные к вирусу Russia/SPE нейтрализуют штаммы альфа и бета VOC соответственно в 4,7 и 16 раз хуже гомологичного вируса. Показано значительное снижение нейтрализующей активности сывороток, специфичных к штаммам, не относящимся к VOC, по отношению к омикрон VOC, в меньшей степени — к дельта VOC.

Генетические варианты коронавируса альфа, бета и гамма VOC циркулировали в основном в период второй волны пандемии. Способность антител, специфичных к этим штаммам, нейтрализовать вирусы, относящиеся к генетическим вариантам омикрон и дельта VOC, низкая. Отличия уровня нейтрализующей активности антител для альфа и бета VOC между собой не значительны, и с вариантом гамма VOC они не имеют достоверных различий. Наиболее иммуногенным из вирусов этой группы является штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (гамма VOC). Иммуногенность дельта VOC, использованных в эксперименте, относительно не высокая. При анализе кросс-реактивности двух дельта VOC между собой показано отсутствие достоверных различий, несмотря на то, что штамм дельта+AY при генетическом анализе отличается от штамма дельта наличием пяти замен в S-сегменте (G142D, E156del, L452R, P681R(674), R685H(692)). Нейтрализующая способность антител специфичных к варианту дельта VOC против альфа и бета VOC снижена в 4 раза, с гамма VOC-вариантом значимых различий не имеет. Антитела, специфичные к варианту дельта+AY, нейтрализуют вирусы альфа, бета и гамма VOC соответственно в 2, 2,5 и 2,8 раз менее эффективно, чем гомологичный штаммы вируса. Кросс-реактивность с вариантами омикрон VOC у дельта VOC низкая.

При анализе кросс-реактивности омикрон VOC показано, что со всеми штаммами, использованными для анализа, она крайне низкая, нейтрализующая активность сывороток, полученных к вариантам омикрон 1 и 2, по отношению к прототипному штамму Ухань снижена в 18 раз, к гамма VOC-варианту — в 12 раз, к дельта VOC-вариантам — более чем в 30 раз, для остальных вариантов она еще ниже. Следует отметить, что сыворотки, полученные к варианту омикрон 2, имеющие титры 1:640 и менее в реакции нейтрализации, с другими вариантами вируса имеют титр нейтрализации > 1:10. Таким образом, кросс-реактивность для этих образцов полноценно оценить не удалось. При анализе кросс-реактивности двух омикрон-вариантов выявлены статистически значимые различия, нейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных омикрон 1 против штамма омикрон 2 снижена в 8 раз, сывороток, специфичных к варианту омикрон 2 по отношению к омикрон 1, — в 6 раз. Штамм омикрон 1 вероятно имеет большую иммуногенность, чем омикрон 2.

Следует отметить, что при использовании штамма hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (гамма) в качестве антигена в реакции нейтрализации, были получены результаты, которые указывают на то, что этот штамм позволяет выявлять антитела в титрах выше, чем с гомологичными антигенами для прототипного варианта вируса Ухань штаммов альфа и бета, а также сероконверсия со штаммами омикрон 1 и 2 была выше, чем с остальными штаммами. Подобные результаты наблюдаются и для штамма Russia/SPE, но в меньшей степени.

Обсуждение

В результате проведенного исследования были получены результаты, которые наглядно демонстрируют состояние кросс-реактивности между штаммами коронавируса SARS-CoV-2, относящимися к разным генетическим линиям, а также внутри одной из групп.

В эксперименте были исследованы сыворотки гипериммунных линейных животных, которых иммунизировали убитыми антигенами с использованием адъювантов, что гарантирует чистоту эксперимента и позволяет получить сыворотки с высокими титрами антител. Следует подчеркнуть необходимость получения сывороток с высокими титрами вируснейтрализующих антител, это позволит получить более высокую статистическую достоверность различий. Выбор адъюванта был обусловлен данными, полученными в ходе испытаний вакцин Ковивак, в состав которой входит гидрооксись алюминия, и Nuvaxovid (NVX-CoV2373), содержащей ИСКОМ-адъювант на основе сапонинов. При сопоставимой концентрации гликопротеина S в препаратах титр нейтрализующих антител в сыворотке крови составил 1:80 и 1:7680–1:20 000 соответственно [8, 14].

В предыдущих работах [4, 16] анализировали сыворотки переболевших людей. В подобных случаях следует учитывать, что индивидуальные особенности организма добровольцев оказывают влияние на формирование иммунного ответа. При использовании линейных лабораторных животных выборка является однородной. Кроме этого, в настоящее время сложно найти добровольцев, переболевших известным генетическим вариантом коронавируса и не имеющих антител к другим вариантам вируса и вакцинным препаратам. В работе представлены результаты реакции нейтрализации с живыми вирусными штамма-

ми в отличие от предыдущих работ, в которых приведены методы оценки нейтрализующей активности антител с использованием псевдовирусной системы [3].

Полученные результаты свидетельствуют о наличии кросс-реактивности между штаммами коронавируса, вызвавшими первую и вторую волны пандемии (Ухань, альфа, бета, гамма). Для дельта-вариантов она слабее, в то время как для вариантов омикрон является крайне низкой. Вероятно, это связано с тем, что генетический вариант омикрон VOC имеет наибольшее количество мутаций по сравнению с предыдущими VOC [13].

Делать вывод на основании представленных данных о степени иммуногенности вирусных штаммов, использованных в эксперименте, мы не можем в связи с отсутствием информации о концентрации антигена. Тем не менее на основании полученных результатов можно сделать предположение о разной иммуногенности штаммов коронавируса. Из исследованных штаммов наибольшей иммуногенностью обладают штаммы омикрон 1, гамма, Russia/SPE. Следует отметить, что высокоиммуногенные варианты коронавируса есть в разных генетических группах. В начале пандемии коронавирусной инфекции много внимания было уделено влиянию тяжести болезни на напряженность иммунитета после перенесенного заболевания. На основании представленной информации можно предположить, что на величину титров вируснейтрализующих антител у переболевших в большей степени оказывает влияние иммуногенность вируса, который вызвал заболевание.

Заключение

Результаты анализа гипериммунных сывороток линейных животных указывают на наличии кросс-реактивности между штаммами коронавируса Ухань, альфа, бета, гамма, для дельта-вариантов она слабее. Мутации в геноме вариантов омикрон VOC привели к значимому снижению антигенных перекрестов с более ранними генетическими вариантами коронавируса.

Полученные результаты объясняют низкую эффективность вакцин, созданных на основе генетического варианта вируса, циркулировавшего в первые недели пандемии, синтетических иммуногенов и рекомбинантных белков на его основе против вариантов омикрон VOC, которые вызвали подъем заболеваемости с начала 2022 г. А также случаи повторного заболевания людей при инфицировании новыми генетическими вариантами коронавируса. Подбор штаммов для создания вакцинных и диагностических препаратов должен обеспечивать максимальный охват антигенных вариантов вируса.

Список литературы/References

1. Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Данильченко Н.В., Святченко С.В., Таранов О.С., Рыжиков А.Б. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адъювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2022. Т. 22, № 2. С. 170–186. [Evseenko V.A., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., Svyatchenko S.V., Taranov O.S., Ryzhikov A.B. Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment, 2022, vol. 22, no. 2, pp. 170–186. (In Russ.)*] *doi: 10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186*
2. Aleem A., Akbar Samad A.B., Slenker A.K. Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Oct 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. *URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580*
3. Choi A., Koch M., Wu K., Dixon G., Oestreicher J., Legault H., Stewart-Jones G.B.E., Colpitts T., Pajon R., Bennett H., Carfi A., Edwards D.K. Serum neutralizing activity of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 variants. *J. Virol., 2021, vol. 95, no. 23: e0131321. doi: 10.1128/JVI.01313-21*
4. Edara V.V., Hudson W.H., Xie X., Ahmed R., Suthar M.S. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants after infection and vaccination. *JAMA, 2021, vol. 325, no. 18, pp. 1896–1898. doi: 10.1001/jama.2021.4388*
5. Harvey W.T., Carabelli A.M., Jackson B., Gupta R.K., Thomson E.C., Harrison E.M., Ludden C., Reeve R., Rambaut A.; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Peacock S.J., Robertson D.L. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol., 2021, vol. 19, no. 7, pp. 409–424. doi: 10.1038/s41579-021-00573-0*
6. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell, 2020, vol. 181, no. 2, pp. 271–280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052*
7. Jennewein M.F., MacCamy A.J., Akins N.R., Feng J., Homad L.J., Hurlburt N.K., Seydoux E., Wan Y.H., Stuart A.B., Edara V.V., Floyd K., Vanderheiden A., Mascola J.R., Doria-Rose N., Wang L., Yang E.S., Chu H.Y., Torres J.L., Ozorowski G., Ward A.B., Whaley R.E., Cohen K.W., Pancera M., McElrath M.J., Englund J.A., Finzi A., Suthar M.S., McGuire A.T., Stamatatos L. Isolation and characterization of cross-neutralizing coronavirus antibodies from COVID-19+ subjects. *Cell Rep., 2021, vol. 36, no. 2: 109353. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109353*

8. Kozlovskaya L.I., Piniaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirkina A.S., Tarasova Y.Y., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moysenovich A.M., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmyl L.V., Ipatova E.G., Kirpichnikov M.P., Egorov A.M., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes. Infect., 2021, vol. 10, no. 1, pp. 1790–1806. doi: 10.1080/22221751.2021.1971569*
9. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet, 2020, vol. 396, no. 10255, pp. 887–897. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3*
10. Piccoli L., Park Y.J., Tortorici M.A., Czudnochowski N., Walls A.C., Beltramello M., Silacci-Fregni C., Pinto D., Rosen L.E., Bowen J.E., Acton O.J., Jaconi S., Guarino B., Minola A., Zatta F., Sprugasci N., Bassi J., Peter A., De Marco A., Nix J.C., Mele F., Jovic S., Rodriguez B.F., Gupta S.V., Jin F., Piumatti G., Lo Presti G., Pellanda A.F., Biggiogero M., Tarkowski M., Pizzuto M.S., Cameroni E., Havenar-Daughton C., Smithey M., Hong D., Lepori V., Albanese E., Ceschi A., Bernasconi E., Elzi L., Ferrari P., Garzoni C., Riva A., Snell G., Sallusto F., Fink K., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Corti D., Veesler D. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 1024–1042.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.037*
11. Reed L.I.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol., 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408*
12. Shiliaev N., Lukash T., Palchevska O., Crossman D.K., Green T.J., Crowley M.R., Frolova E.I., Frolov I. Natural and recombinant SARS-CoV-2 isolates rapidly evolve in vitro to higher infectivity through more efficient binding to heparan sulfate and reduced S1/S2 cleavage. *J. Virol., 2021, vol. 95, no. 21: e0135721. doi: 10.1128/JVI.01357-21*
13. Thakur V., Ratho R.K. OMICRON (B.1.1.529): a new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear. *J. Med Virol., 2022, vol. 94, pp. 1821–1824. doi: 10.1002/jmv.27541*
14. Tian J.H., Patel N., Haupt R., Zhou H., Weston S., Hammond H., Logue J., Portnoff A.D., Norton J., Guebre-Xabier M., Zhou B., Jacobson K., Maciejewski S., Khatoon R., Wisniewska M., Moffitt W., Kluepfel-Stahl S., Ekechukwu B., Papin J., Boddapati S., Jason Wong C., Piedra P.A., Frieman M.B., Massare M.J., Fries L., Bengtsson K.L., Stertman L., Ellingsworth L., Glenn G., Smith G. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat. Commun., 2021, vol. 12, no. 1: 372. doi: 10.1038/s41467-020-20653-8*
15. Tregoning J.S., Flight K.E., Higham S.L., Wang Z., Pierce B.F. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat. Rev. Immunol., 2021, vol. 21, no. 10, pp. 626–636. doi: 10.1038/s41577-021-00592-1*
16. Trombetta C.M., Marchi S., Viviani S., Manenti A., Benincasa L., Ruello A., Bombardieri E., Vicenti I., Zazzi M., Montomoli E. Serum neutralizing activity against B.1.1.7, B.1.351, and P.1 SARS-CoV-2 variants of concern in hospitalized COVID-19 patients. *Viruses, 2021, vol. 13, no. 7: 1347. doi: 10.3390/v13071347*

Авторы:

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

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

Поступила в редакцию 15.07.2022
Принята к печати 11.02.2023

Received 15.07.2022
Accepted 11.02.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 46–54

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 46–54

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ У МАТЕРЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 НА РАЗНЫХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

Е.В. Инвияева, Ю.А. Косолапова, Л.В. Кречетова, В.В. Вторушина, М.И. Макиева, В.В. Зубков

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Взаимосвязь между заболеваемостью COVID-19 беременных, перенесших коронавирусную инфекцию на разных сроках гестации, и состоянием здоровья рожденных от них детей вызывает большой интерес. Убедительных данных, полно отражающих особенности течения неонатального периода, состояния иммунной системы, влияющих на особенности ведения постнатального периода у данной категории детей, недостаточно. Исходя из изложенного становится очевидной актуальность исследования, целью которого явилось изучение особенностей клинико-иммунологического состояния здоровья новорожденных у матерей, перенесших новую коронавирусную инфекцию COVID-19 на разных сроках гестации. В проспективное исследование были включены 131 женщина и 132 ребенка. Основную группу составили женщины (n = 61), перенесшие COVID-19 во время беременности, и их новорожденные дети (n = 62) гестационного возраста (ГВ) 37–41 неделя, группу сравнения — женщины без лабораторно подтвержденного COVID-19 во время беременности (n = 70) и их новорожденные дети (n = 70) того же ГВ. При анализе анамнеза пациенток не было отмечено значимых различий по соматическим и акушерско-гинекологическим заболеваниям. Анализ течения настоящей беременности выявил, что статистически значимо чаще в основной группе проводилась терапия низкомолекулярными гепаринами. Срок и частота родоразрешения путем кесарева сечения у беременных в основной группе не имели статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой. Значимых различий по частоте причин, определявших тяжесть состояния новорожденных у матерей, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации, выявлено не было. Проведено исследование субпопуляционного состава лимфоцитов, фагоцитарной активности нейтрофилов и определение антител класса IgG к SARS-CoV-2. При исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов новорожденных, рожденных у матерей, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации, выявлены различия только в содержании NK-клеток ($CD56^+$) у детей, рожденных у матерей, переболевших COVID-19 в первом триместре. В приведенном исследовании в целом не было выявлено тяжелых перинатальных исходов у новорожденных, матери

Адрес для переписки:
Инвияева Евгения Владимировна
117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, 4,
ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
E-mail: e_inviyaeva@oparina4.ru

Contacts:
Evgeniya V. Inviyaeva
117997, Russian Federation, Moscow, Academician Oparina str., 4,
National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.
Phone: +7 (495) 438-11-83.
E-mail: e_inviyaeva@oparina4.ru

Для цитирования:
Инвияева Е.В., Косолапова Ю.А., Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Макиева М.И., Зубков В.В. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов новорожденных детей, рожденных у матерей, перенесших COVID-19 на разных сроках беременности // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 46–54. doi: 10.15789/2220-7619-FOL-2098

Citation:
Inviyaeva E.V., Kosolapova Yu.A., Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Makieva M.I., Zubkov V.V. Features of lymphocyte subset composition in neonates born to mothers suffered from COVID-19 at different stages of pregnancy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 46–54. doi: 10.15789/2220-7619-FOL-2098

© Инвияева Е.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-FOL-2098

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

которых перенесли COVID-19 во время беременности. В исследованной выборке матерей не было случаев среднетяжелого и тяжелого течения COVID-19. Поэтому необходимы дальнейшие проспективные исследования, чтобы оценить влияние степени тяжести COVID-19 на исходы родов для матери и плода и уточнить оптимальное ведение беременных в таких случаях.

Ключевые слова: *субпопуляции лимфоцитов, NK-клетки, новорожденные, беременность, SARS-CoV-2, COVID-19.*

FEATURES OF LYMPHOCYTE SUBSET COMPOSITION IN NEONATES BORN TO MOTHERS SUFFERED FROM COVID-19 AT DIFFERENT STAGES OF PREGNANCY

Inviyaeva E.V., Kosolapova Yu.A., Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Makieva M.I., Zubkov V.V.

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. The relationship between the incidence of COVID-19 in pregnant women who have had a coronavirus infection at different gestational ages and the health status of paired neonates is of great interest. However, no sufficient convincing data fully reflecting features of subsequent neonatal period, the state of the immune system in this category of children, affecting characteristics of postnatal period have been accumulated. Based on this, it underlies the relevance of the current study aimed at investigating parameters of clinical and immunological state of neonatal health after paired mothers recovered from COVID-19 at different gestational ages. The prospective study included 131 women and 132 children. The main group consisted of women (n = 61) who had COVID-19 during pregnancy and paired newborns (n = 62) at gestational age (GA) of 37–41 weeks, the comparison group — women without laboratory-confirmed COVID-19 during pregnancy (n = 70) and paired newborns (n = 70) of similar gestational age. While analyzing the anamnesis of the patients, no significant differences in somatic and obstetric-gynecological diseases were found. Analyzing course of pregnancy revealed that low molecular weight heparins were significantly more often applied in the main group. The term and frequency of delivery by caesarean section in pregnant women in the main group did not significant differ from that of the control group. No significant difference in the frequency of causes accounting for the severity of the condition of neonates in paired mothers with COVID-19 at different trimester of gestation was found. Investigating lymphocyte subset composition, neutrophil phagocytic activity, and IgG class antibodies specific to SARS-CoV-2 was carried out. It was found that lymphocyte subset profile in newborns from paired mothers with COVID-19 at different trimesters of gestation differed only in the level of NK cells ($CD56^+$) in children born to mothers recovered from COVID-19 in the first trimester. In this study, in general, no severe perinatal outcomes in newborns from paired mothers with COVID-19 during pregnancy were documented. No cases of moderate or severe maternal COVID-19 were observed. Therefore, further prospective studies are needed to assess an impact of COVID-19 severity on maternal and fetal birth outcomes and clarify optimal management of pregnant women in such cases.

Key words: *subpopulations of lymphocytes, NK-cells, newborns, pregnancy, SARS-CoV-2, COVID-19.*

Введение

Впервые возникшая в Ухане (Китай) в 2019 г. вспышка новой коронавирусной инфекции быстро распространилась по всему миру и привела к чрезвычайной ситуации в области здравоохранения. SARS-CoV-2 принадлежит к семейству коронавирусов человека, и, поскольку эта инфекция имеет тенденцию к пандемии, она затронула все слои населения, в том числе и беременных.

Отсутствие достаточных знаний о патогенезе заболевании и специфических методах лечения, неоднородность результатов многих исследований и, как правило, предварительный характер сделанных в этих исследованиях заключений предполагает осторожность при окончательных выводах о влиянии COVID-19 на исходы беременности и состояние здоровья новорожденных [1, 10].

Как указывают опубликованные данные, у 85% женщин, заразившихся SARS-CoV-2, болезнь протекает в легкой форме. Показатели тяжелого заболевания варьируются от 9,3 до 11,1%, а показатели критического заболевания варьируются от 2 до 6,9%, что также близко к показателям для населения в целом [2].

Взаимосвязь между заболеваемостью COVID-19 беременных и состоянием здоровья рожденных от них детей вызывает большой интерес. Ранний неонатальный период является первым из критических периодов постнатального развития, и его течение предопределяет состояние здоровья ребенка и в будущем.

Особый интерес в настоящее время представляет категория детей, рожденных у женщин, перенесших коронавирусную инфекцию на разных сроках гестации. Убедительных данных, полно отражающих особенности течения неонатального периода, состояния иммунной системы, влияющих на особенности ведения постнатального периода у данной категории детей, недостаточно. Исходя из изложенного, ста-

новится очевидной актуальность исследования, целью которого стало изучение особенностей клинико-иммунологического состояния здоровья новорожденных от матерей, перенесших новую коронавирусную инфекцию COVID-19 на разных сроках гестации.

Материалы и методы

В проспективное исследование были включены 131 женщина и 132 ребенка, которые были рождены в ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России. Критериями включения в исследование были: доношенный срок беременности, отсутствие лабораторно подтвержденного COVID-19 в родах; критериями исключения — дети с врожденными пороками развития, требующие хирургической коррекции, рожденные в состоянии тяжелой асфиксии, транспортированные из других учреждений. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России.

Пациенты были разделены на 2 группы: основная группа, которую составили женщины (n = 61), перенесшие COVID-19 во время беременности, и их новорожденные дети (n = 62) гестационного возраста (ГВ) 37–41 неделя, и группа сравнения — женщины без лабораторно подтвержденного COVID-19 во время беременности (n = 70) и их новорожденные дети (n = 70) того же ГВ. В зависимости от срока перенесенной новой коронавирусной инфекции дети основной группы были разделены на 3 подгруппы: 1 подгруппа — дети, матери которых перенесли COVID-19 в 1 триместре (n = 19), 2 подгруппа — дети, матери которых перенесли COVID-19 во 2 триместре (n = 19), 3 подгруппа — дети, матери которых перенесли COVID-19 в 3 триместре (n = 24).

Взятие крови у детей основной группы осуществляли из периферической вены на 2 сутки рождения с целью исключения инфекционно-воспалительного процесса, у детей группы сравнения — в рамках программы «Мое первое обследование». Родителями было подписано информированное согласие на исследование периферической крови.

В периферической крови оценивали общее число лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов на гематологическом анализаторе System XS 800i. Субпопуляционный состав лимфоцитов проводили по следующим маркерам дифференцировки: $CD45^+$, $CD3^+$, $CD56^+$, $CD19^+$ с использованием моноклональных антител CYTOSTAT (Beckman Coulter, США). Фагоцитарную активность нейтрофилов и окислительного взрыва определяли, используя набор FagoFlowEX Kit (EXBIO, Чехия), анализы проводили на проточном цитофлуориметре Gallios (Beckman Coulter, США).

Определение антител IgG к SARS-CoV-2 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке (плазме) крови «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G(S)» (НПО «Диагностические системы», Россия). Учет результатов осуществляли на спектрофотометре Infinite F50 (Tecan, Австрия). Согласно инструкции компании-производителя, тест предназначен для качественного и полуколичественного определения антител. Для интерпретации результата используется индекс позитивности (ИП), который рассчитывается по формуле: ИП = ОП образца/cut-off, где ОП образца — величина оптической плотности образца. При ИП > 1,2 — образец положительный, при ИП < 0,8 — образец отрицательный. При значении ИП, лежащем в промежутке от 0,8 до 1,2, результат сомнительный (неопределенный).

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью таблиц «Microsoft Excel» и MedCalc® (версия 16.8). Для анализа количественных данных в группах сравнения определяли вид распределения данных с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Данные представлены средней арифметической величиной и стандартным отклонением [M (SD)], при отклонении распределения данных от нормального применяли методы непараметрической статистики с оценкой медианы и верхней, и нижней квартили [Me (Q1; Q3]). Для оценки межгрупповых различий использовали критерий Краскелла–Уоллиса при сравнении данных в трех группах с контролем, различия считали значимыми при $p < 0,017$; при попарных сравнения использовали критерий Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки различий качественных переменных использовали точный критерий Фишера, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Клинико-анамнестическая характеристика обследованных беременных представлена в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, женщины основной и контрольной групп были сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$). При анализе анамнеза пациенток не было отмечено значимых различий по соматическим и акушерско-гинекологическим заболеваниям. Анализ течения настоящей беременности выявил, что статистически значимо чаще в основной группе проводилась терапия низкомолекулярными гепаринами.

Срок и частота родоразрешения путем кесарева сечения у беременных в основной группе не имели статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой. Самопроизвольные влагалищные роды произошли у 77% (47/61) женщин с COVID-19 и у 81% в группе сравнения (57/70), p > 0,05, а частота родоразрешения путем кесарева сечения составила 23% (14/61) в основной группе и 19% (13/70) в группе сравнения, p > 0,05.

Антропометрические характеристики, пол, гестационный возраст и оценка состояния новорожденных детей по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах после рождения представлены в табл. 2.

При анализе антропометрических данных, гестационного возраста и оценки по шкале Апгар статистически значимых различий в исследуемых группах обнаружить не удалось.

Признаки задержки внутриутробного развития (показатели физического развития менее 10-го перцентиля по кривым Intergrowth-21) среди новорожденных детей, рожденных у матерей, перенесших новую коронавирусную инфекцию во время беременности, составила 2% (1/62); в группе сравнения показатели физического развития менее 10-го перцентиля по кривым Intergrowth-21 среди новорожденных детей встречались с частотой 4% (3/70); различия не значимы (p > 0,05).

В оказании специализированной медицинской помощи в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) нуждался 1 ребенок из основной группы 2% (1/62), из контрольной группы реанимационная помощь детям не требовалась (0/70), различия не значимы (p > 0,05).

Наблюдение и лечение в условиях отделения патологии новорожденных и недоношенных детей (ОПННД) проводилось 10% (6/62) новорожденным детям основной группы; в группе сравнения оказания помощи в условиях ОПННД потребовалось 1 ребенку (1%, 1/70) (p = 0,03).

Причинами, определявшими тяжесть состояния детей основной группы, потребовавших стационарного лечения, были: перинатальные инфекции (пневмония, ринит, отит), гипербилирубинемия новорожденных, врожденные

Таблица 1. Клинико-анамнестическая характеристика пациенток, перенесших новую коронавирусную инфекцию во время беременности

Table 1. Clinical and anamnestic characteristics of patients with COVID-19 during pregnancy

	Основная группа Main group **n = 61**	**Группа сравнения** Comparison group **n = 70**	**p-значение** p-value
Возраст, лет* Age, years*	32,1±4,7	31,6±4,1	> 0,05
ВРТ, абс. (%) IVF, abs. (%)	6 (10%)	7 (10%)	> 0,05
Выкидыш в анамнезе, абс. (%) History of miscarriage, abs. (%)	10 (16%)	14 (20%)	> 0,05
Хроническая артериальная гипертензия, абс. (%) Chronic arterial hypertension, abs. (%)	4 (6%)	3 (3%)	> 0,05
Наследственные тромбофилии, абс. (%) Hereditary thrombophilias, abs. (%)	3 (5%)	3 (3%)	> 0,05
Нарушение жирового обмена, абс. (%) Impaired fat metabolism, abs. (%)	25 (41%)	20 (29%)	> 0,05
Угроза прерывания беременности, абс. (%) Threatened miscarriage, abs. (%)	14 (23%)	21 (30%)	> 0,05
Гипотиреоз, абс. (%) Hypothyroidism, abs. (%)	12 (20%)	9 (13%)	> 0,05
ГСД, абс. (%) GDM, abs. (%)	10 (16%)	11 (16%)	> 0,05
Анемия, абс. (%) Anemia, abs. (%)	32 (52%)	27 (39%)	> 0,05
Терапия НМГ, абс. (%) Therapy LWH, abs. (%)	19 (31%)	7 (10%)	0,017
ИЦН, абс. (%) ICI, abs. (%)	5 (8%)	6 (9%)	> 0,05

Примечание. *Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение, различия оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия по качественным признакам значимы по точному критерию Фишера при p < 0,05.

Note. *Data are presented as mean and standard deviation, differences were assessed by using Student's t-test. Differences in qualitative parameters are significant according to Fisher's exact test at p < 0.05.

пороки сердца (ВПС), а именно: дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП), межпредсердное сообщение (МПС более 5 мм). Однако частота встречаемости указанных состояний у детей основной и контрольной групп были сопоставимы ($p > 0,05$), при этом частота выявления внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК) 1 степени у новорожденных основной группы была значимо выше, чем у детей группы сравнения (8% (5/62) и 0% (0/70), $p = 0,02$).

Частота причин, определявших тяжесть состояния новорожденных у матерей, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации, представлена в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, значимых различий в исследуемых группах не выявлено.

На вторые сутки после рождения у детей, рожденных от матерей, перенесших COVID-19, был исследован субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, представленный в табл. 4, с учетом триместра, в котором матери болели коронавирусной инфекцией. Также в этой таблице представлены результаты анализа антител класса IgG к SARS-CoV-2.

Как следует из данных, представленных в табл. 4, выявлены различия только в содержании NK-клеток ($CD56^+$) у детей, рожденных от матерей, переболевших COVID-19 в первом триместре.

На рисунке представлена сравнительная характеристика субпопуляционного состав лимфоцитов детей, рожденных от матерей, перенесших COVID-19, и детей группы сравнения. Данные на рисунке представлены в виде отношения медиан содержания показателя в группе новорожденных от матерей, перенесших COVID-19 во время беременности, к медианам содержания показателя в группе сравнения. P-значения указаны для медиан исследованных показателей.

Из показателей, представленных на рисунке, обращает на себя внимание более низкое содержание лейкоцитов и лимфоцитов в основной группе, увеличенное содержание Т-лимфоцитов, низкое — В-лимфоцитов, NK-клеток и равное с контролем содержание нейтрофилов при сниженной их фагоцитарной активности. Однако следует отметить, что значения содержания субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарной активности нейтрофилов хотя и отличаются

Таблица 2. Показатели антропометрии, оценки по Апгар при рождении у детей в исследуемых группах
Table 2. Anthropometry parameters, Apgar scores at birth in children in the study groups

Показатели антропометрии Anthropometry indicators	**Основная группа** Main group **n = 62**	**Группа сравнения** Comparison group **n = 70**	**p-значение** p-value
Гестационный возраст, недели* Gestational age, weeks*	39,5±1,1	39±0,8	> 0,05
Масса, г* Weight, g*	3477±475	3422±412	> 0,05
Длина, см* Length, cm*	53±2,3	52,3±2,2	> 0,05
Апгар на 1 мин, балл* Apgar at 1 min, score*	7,96±0,2	7,9±0,2	> 0,05
Апгар на 5 мин, балл* Apgar at 5 min, score*	8,98±0,1	8,9±0,3	> 0,05
Мальчики, абс. (%) Boys, abs. (%)	33 (53,2%)	34 (48,6%)	> 0,05
Девочки, абс. (%) Girls, abs. (%)	29 (46,8%)	36 (51,4%)	> 0,05
Весом 2000–2500 г, абс. (%) Weighed 2000–2500 g, abs. (%)	1 (2%)	2 (3%)	> 0,05
Весом 4000–4500 г, абс. (%) Weighed 4000–4500 g, abs. (%)	8 (13%)	7 (10%)	> 0,05
Более 4500 г, абс. (%) Weighed more than 4500 g, abs. (%)	1 (2%)	0 (0%)	> 0,05
Крупновесный для ГВ, абс. (%) Large-weight newborn for gestational age, abs. (%)	15 (24%)	16 (23%)	> 0,05
Маловесный к ГВ, абс. (%) Small-weight newborn for gestational age, abs. (%)	1 (2%)	3 (4%)	> 0,05

Примечание. *Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение, различия оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия по качественным признакам оценивали по точному критерию Фишера.

Note. *Data are presented as mean and standard deviation, differences were assessed by Student's t-test. Differences in qualitative characteristics were assessed by Fisher's exact test.

Таблица 3. Заболевания новорожденных детей у матерей, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации

Table 3. Diseases of newborns from paired mothers with COVID-19 at different trimesters of pregnancy

Перечень заболеваний List of diseases	**Заболевания детей у матерей, перенесших COVID-19 в триместрах** Diseases in neonates from paired mothers with COVID-19 at various trimesters			**Группа сравнения** Comparison group **n = 70**	**p-значение** p-value
	1 (n = 19)	**2 (n = 19)**	**3 (n = 24)**		
Пневмония, абс. (%) Pneumonia, abs. (%)	0 (0)	0 (0)	1 (4,2)	0 (0)	> 0,017
Ринит, абс. (%) Rhinitis, abs. (%)	1 (5,3)	0 (0)	2 (8,3)	0 (0)	> 0,017
Отит, абс. (%) Otitis, abs. (%)	1 (5,3)	0 (0)	2 (8,3)	0 (0)	> 0,017
Гипербилирубинемия, абс. (%) Hyperbilirubinemia, abs. (%)	0 (0)	0 (0)	1 (4,2)	0 (0)	> 0,017
Анемия, абс. (%) Anemia, abs. (%)	3 (15,8)	1 (5,3)	1 (4,2)	3 (4)	> 0,017
МПС, абс. (%) IAC, abs. (%)	0 (0)	1 (5,3)	2 (8,3)	1 (1)	> 0,017
ДМЖП, абс. (%) DVS, abs. (%)	0 (0)	1 (5,3)	0 (0)	1 (1)	> 0,017
ВЖК 1 степени, абс. (%) IVH, degree 1 abs. (%)	3 (15,8)	1 (5,3)	1 (5,3)	0 (0)	> 0,017

Примечание. Различия по качественным признакам, оцениваемые по точному χ^2-критерию Пирсона, значимы при $p < 0,017$ с учетом поправки для множественных сравнений с контролем.

Note. Differences in qualitative characteristics, assessed by Pearson's exact χ^2-test, are significant at $p < 0.017$, adjusted for multiple comparisons vs controls.

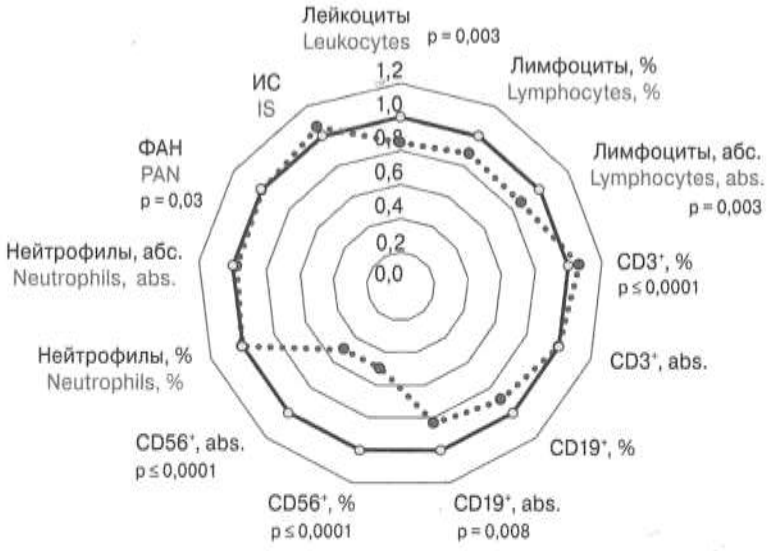


Рисунок. Показатели состояния иммунной системы обследованных новорожденных

Figure. Parameters of immune system status in examined newborns

Примечание. Данные представлены как отношения медиан содержания показателя в группе новорожденных от матерей, перенесших COVID-19 во время беременности, к медианам содержания показателя в группе сравнения. Черной линией обозначен уровень равенства значений. P-значения указаны для медиан исследованных показателей.

Note. The data are presented as the ratio of the median parameter level in the main vs comparison group of newborns from mothers with COVID-19 during pregnancy. The black line indicates the level of value equality. P-values are shown for the medians of the studied parameters.

Таблица 4. Показатели состояния иммунной системы новорожденных у матерей, перенесших COVID-19 в разные триместры гестации [Me (Q1; Q3)]

Table 4. parameters of immune system state in newborns from paired mothers with COVID-19 at different trimesters of gestation [Me (Q1; Q3)]

Показатель, ед. изм. Index, units	**Значение показателя у новорожденных, матери которых перенесли COVID-19** Magnitude of parameter in newborns from paired mothers with COVID-19			**p-значение** p-value
	в 1 триместре in the 1st trimester	**во 2 триместре** in the 2nd trimester	**в 3 триместре** in the 3rd trimester	
Лейкоциты, 10^9 клеток/л Leukocytes, 10^9 cell/l	13,9 (10,6; 18,1)	15,0 (13,1; 16,7)	13,6 (11,9; 17,0)	0,82
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	26,7 (22,9; 30,7)	29,6 (23,8; 35,2)	26,7 (22,0; 37,1)	0,49
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	3,7 (2,9; 4,6)	4,3 (3,5; 4,8)	4,1 (3,5; 5,0)	0,34
$CD3^+$, %	84,5 (77,7; 87,2)	84,8 (79,3; 88,0)	83,6 (78,4; 86,8)	0,67
$CD3^+$, абс. $CD3^+$, abs.	2,8 (2,5; 4,0)	3,5 (2,8; 4,3)	3,6 (2,8; 4,2)	0,23
$CD19^+$, %	13,1 (8,6; 20,0)	10,4 (7,6; 12,0)	12,0 (9,4; 16,2)	0,23
$CD19^+$, абс. $CD19^+$, abs.	0,4 (0,3; 0,8)	0,5 (0,3; 0,6)	0,5 (0,4; 0,7)	0,75
$CD56^+$, %	1,3 (1,2; 1,6)	1,8 (1,6; 2,4)	1,9 (1,5; 3,7)	$p_{1-2} = 0,011$ $p_{1-3} = 0,011$
$CD56^+$, абс. $CD56^+$, abs.	0,10 (0,00; 0,10)	0,10 (0,03; 0,10)	0,10 (0,10; 0,10)	$p_{1-3} = 0,009$
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	53,0 (50,8; 61,4)	51,1 (47,8; 57,6)	50,3 (41,3; 56,8)	0,09
Нейтрофилы, абс. Neutrophils, abs.	7,7 (6,2; 10,1)	7,3 (6,7; 9,5)	7,1 (4,9; 9,5)	0,59
ФАН, % PhAN, %	97,0 (96,1; 98,2)	97,0 (95,2; 98,0)	98,4 (96,0; 99,1)	0,09
ИС IS	35,0 (31,0; 52,5)	43,0 (31,3; 55,8)	55,5 (39,5; 67,5)	0,05
IgG к SARS-CoV-2, ИП IgG to SARS-CoV-2, IP	10,6 (2,3; 12,1)	4,3 (1,0; 6,8)	5,7 (0,3; 11,5)	0,13

Примечание. ИП — индекс позитивности. Различия показателей значимы по критерию Краскелла–Уоллиса с поправкой Бонферрони при $p < 0,017$.

Note. IP — Index Positivity. Differences in indicators are significant according to the Kruskal–Walli's test with the Bonferroni correction at $p < 0.017$.

между группами, остаются в пределах референсных значений, а содержание NK-клеток в основной группе в 2 раза ниже уровня референсных значений.

Обсуждение

В настоящее время имеется немало публикаций в литературе, указывающих на сниженное количество киллерных клеток у больных COVID-19 различной степени тяжести наряду со снижением лимфоцитов других субпопуляций (кроме того, общая лимфопения является лабораторным показателем, характерным для коронавирусной инфекции среднетяжелого и тяжелого течения). Снижение киллерных клеток при вирусной инфекции вызывает научный интерес, поскольку это клетки первой линии врожденной защиты, осуществляемой непосредственно путем элиминации инфицированных вирусом клеток. Было установлено, что снижение содержания NK-клеток может быть связано с прямым инфицированием киллерных клеток. Этот феномен показан для инфицирования рядом оболочечных вирусов, к которым относится и SARS-CoV-2 [7].

Инфицирование отражает способность вирусов уклоняться от иммунного надзора и осуществляется либо через связывание со специфическими рецепторами и слияния непосредственно с плазматической мембраной, либо путем эндоцитоза вирусной частицы, посредством макропиноцитоза (или неспецифическое поглощение внеклеточного материала). Кроме

того, проникновение в NK-клетки возможно через FcγRIIIA IgG-рецептор, экспрессируемый на NK-клетках, который опосредует связывание вируса с NK-клетками в присутствии вирус-специфических антител. Проникновение, опосредованное антителами, показано для многих оболочечных вирусов в качестве механизма для проникновения в NK-клетки у людей, которые несут субнейтрализующие вирус-специфические антитела [8].

Инфицирование NK-клеток приводит к истощению NK-клеток посредством апоптоза. Меняя метаболизм и энергетический обмен киллерных клеток, вирусы способствуют искажению фенотипа этих клеток, изменению продукции цитокинов и хемокинов и, следовательно, искажению взаимодействия с макрофагами и Т-лимфоцитами [3, 11].

Конечно, нет убедительных и подтвержденных доказательств трансплацентарного переноса вируса SARS-CoV-2 от инфицированной матери. Однако поступление информации от материнских иммунокомпетентных клеток, инфицированных вирусом, в кровь плода, представляется естественным процессом, который может оказывать влияние на созревание иммунной системы плода. И если в настоящее время механизмы такой передачи информации гипотетические, то полученный нами результат о значительно более низком уровне NK-клеток у детей, рожденных у матерей, переболевших COVID-19 в первом триместре, заставляет задуматься о последствиях таких процессов. Известно, что функция NK-клеток жестко регулируется балансом активирующих и ингибирующих рецепторов, кодируемых зародышевой линией [4, 5, 6, 9].

Поэтому требуются дальнейшие исследования фенотипа и функциональной активности NK-клеток детей, рожденных от матерей, перенесших COVID-19 во время беременности, и сбор данных катамнеза, чтобы сделать вывод о значимости полученных нами результатов и ретроспективно судить о состоянии здоровья обследованных новорожденных.

Заключение

Основываясь на последних эпидемиологических данных по COVID-19 и течению беременности на фоне инфекции, недостаточно данных о повышенном риске для матери и плода, кроме того, нет подтвержденных данных о взаимосвязи в возникновении у плодов пороков развития, связанных с данной инфекцией. Важно учитывать, что пандемия COVID-19 может вызывать психологический стресс и тревогу у беременных женщин, которые могут оказывать неблагоприятное влияние как на течение беременности, так и на состояние иммунной системы их новорожденных.

В проведенном нами исследовании в целом не было выявлено тяжелых перинатальных исходов у новорожденных, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности. В исследованной выборке матерей не было случаев среднетяжелого и тяжелого течения COVID-19. Поэтому необходимы дальнейшие проспективные исследования, чтобы оценить влияние степени тяжести COVID-19 на исходы родов для матери и плода и уточнить оптимальное ведение беременных в таких случаях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Косолапова Ю.А., Борис Д.А., Полуденко Н.Д., Макиева М.И., Никитина И.В., Инвияева Е.В., Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Миханошина Н.В., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н. Влияние новой коронавирусной инфекции COVID-19, перенесенной женщинами во время беременности, на состояние здоровья новорожденных детей // Акушерство и гинекология. 2022. № 11. С. 90–98. [Kosolapova Yu.A., Boris D.A., Poludenko N.D., Makieva M.I., Nikitina I.V., Inviyaeva E.V., Vtorushina V.V., Krechetova L.V., Mikhanoshina N.V., Zubkov V.V., Degtyarev D.N. The impact of the new coronavirus infection COVID-19 in women during pregnancy on the health status of newborns. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology, 2022, no. 11, pp. 90–98. (In Russ.)*] *doi: 10.18565/aig.2022.11.90-98*
2. Api O., Sen C., Debska M., Saccone G., D'Antonio F., Volpe N., Yayla M., Esin S., Turan S., Kurjak A., Chervenak F. Clinical management of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in pregnancy: recommendations of WAPM — World Association of Perinatal Medicine. *J. Perinat. Med., 2020, vol. 48, no. 9, pp. 857–866. doi: 10.1515/jpm-2020-0265*
3. Heltzer M.L., Coffin S.E., Maurer K., Bagashev A., Zhang Z., Orange J.S., Sullivan K.E. Immune dysregulation in severe influenza. *J. Leukoc. Biol., 2009, vol. 85, no. 6, pp. 1036–1043. doi: 10.1189/jlb.1108710*
4. Karre K. NK cells. MHC class I molecules and the missing self. *Scand. J. Immunol., 2002, vol. 55, no. 3, pp. 221–228. doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01053.x*
5. Lanier L.L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol., 2008, vol. 9, no. 5, pp. 495–502. doi: 10.1038/ni1581*
6. Schuster I.S., Coudert J.D., Andoniou C.E., Degli-Esposti M.A. "Natural Regulators": NK cells as modulators of T cell immunity. *Front. Immunol., 2016, vol. 7: 235. doi: 10.3389/fimmu.2016.00235*
7. Smyth M.J., Cretney E., Kelly J.M., Westwood J.A., Street S.E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S.L., Degli-Esposti M.A., Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol., 2005, vol. 42, no. 4, pp. 501–510. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034*

8. Van Erp E.A., Feyaerts D., Duijst M., Mulder H.L., Wicht O., Luytjes W., Ferwerda G., van Kasteren P.B. Respiratory syncytial virus (RSV) infects primary neonatal and adult natural killer cells and affects their antiviral effector function. *J. Infect. Dis., 2019, vol. 219, no. 5, pp. 723–733. doi: 10.1093/infdis/jiy566*
9. Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol., 2008, vol. 9, no. 5, pp. 503–510. doi: 10.1038/ni1582*
10. Wang S.S., Zhou X., Lin Xg., Liu Y., Wu J.-Li., Sharifu L.M., Hu X.-L., Rong Z.-H., Liu W., Luo X.-P., Chen Z., Zeng W.-J., Chen S.-H., Ma D., Chen L., Feng L. Experience of clinical management for pregnant women and newborns with novel coronavirus pneumonia in Tongji hospital, China. *Curr. Med. Sci., 2020, vol. 40, no. 2, pp. 285–289. doi: 10.1007/s11596-020-2174-4*
11. Welliver T.P., Garofalo R.P., Hosakote Y., Hintz K.H., Avendano L., Sanchez K., Velozo L., Jafri H., Chavez-Bueno S., Ogra P.L., McKinney L.A., Reed J.L., Welliver R.C. Sr. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J. Infect. Dis., 2007, vol. 195, no. 8, pp. 1126–1136. doi: 10.1086/512615*

Авторы:

Инвияева Е.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России (ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России), Москва, Россия;
Косолапова Ю.А., врач-неонатолог, младший научный сотрудник отделения новорожденных № 2 ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;
Кречетова Л.В., д.м.н., зав. лабораторией клинической иммунологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;
Вторушина В.В., к.м.н., врач иммунолог-аллерголог ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;
Макиева М.И., к.м.н., врач-неонатолог, зав. отделением новорожденных № 2 ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия;
Зубков В.В., д.м.н., профессор, директор Института неонатологии и педиатрии ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Inviyaeva E.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Kosolapova Yu.A., Neonatologist, Junior Researcher, Neonatal Department No 2, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Krechetova L.V., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Vtorushina V.V., PhD (Medicine), Immunologist-Allergist, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Makieva M.I., PhD (Medicine), Neonatologist, Head of the Neonatal Department No 2, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Zubkov V.V., DSc (Medicine), Professor, Director of the Institute of Neonatology and Pediatrics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.12.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 14.12.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 55–66
Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 55–66

ПОДДЕРЖАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

А.П. Топтыгина[1,3], З.Э. Афридонова[1], Р.Ш. Закиров[2], Е.Л. Семикина[2,4]

[1] *ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия*
[2] *ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия*
[3] *ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[4] *ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

Резюме. Вопрос о продолжительности и эффективности постинфекционного иммунитета к SARS-CoV-2 и сопоставление его с поствакцинальным остается в центре изучения многих исследователей. Целью работы было исследование продолжительности поддержания постинфекционного и поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, а также формирование гибридного (вакцинация после перенесенной инфекции) и прорывного (повторное заболевание или заболевание после вакцинации) иммунитета в условиях продолжающейся пандемии. Обследованы 1–6 раз 107 взрослых, перенесших COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, спустя 3–18 месяцев после заболевания, и 30 человек, привитых двукратно вакциной «Спутник V». Антитела к вирусу SARS-CoV-2 определяли методом ИФА на тест-системах «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ». Авидность антител определяли с помощью дополнительной инкубации с денатурирующим раствором и без него. Мононуклеары выделяли из крови методом градиентного центрифугирования, инкубировали с S-белком коронавируса и без него 20 ч, окрашивали флюоресцентно-меченными антителами и подсчитывали процент $CD8^{high}CD107a^{+}$ на цитометре FACSCanto II. Показано, что в группе переболевших и привитых уровень специфичных к вирусу антител снижался более выражено у лиц с изначально высоким гуморальным ответом, но после 9-и месяцев снижение замедлялось и выходило на плато. Авидность антител поднималась до 50% и сохранялась 18 мес. Клеточный иммунитет у переболевших не менялся на протяжении 1,5 лет, а у привитых постепенно снижался после 6 мес., но оставался на детектируемом уровне. После ревакцинации привитых отмечен значимый подъем уровня антител, авидности до 67,6% и клеточного иммунитета до исходного уровня. Гибридный иммунитет оказался значимо более высоким, чем постинфекционный и поствакцинальный. Уровень антител возрос до 1218,2 BAU/мл, авидность — до 69,85%, а клеточный иммунитет — до 9,94%. Прорывной иммунитет был значимо выше, чем после первого заболевания. Уровень антител поднялся до 1601 BAU/мл, авидность — до 81,6%, клеточный иммунитет — до 13,71%. На примере динамического наблюдения за четырьмя лицами, перенесшими COVID-19, показано, что в условиях продолжающейся пандемии и активной мутации коронавируса происходит естественное бустирование, как бессимптомно, так и в результате легкой повторной инфекции, что препятствует исчезновению гуморального и клеточного иммунитета, специфичного к SARS-CoV-2.

Ключевые слова: *COVID-19, SARS-CoV-2, антитела, вакцинация, гибридный иммунитет, клеточный иммунитет, прорывной иммунитет.*

Адрес для переписки:
Топтыгина Анна Павловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.
Тел.: 8 916 389-66-04. Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Contacts:
Anna P. Toptygina
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 916 389-66-04. Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Для цитирования:
Топтыгина А.П., Афридонова З.Э., Закиров Р.Ш., Семикина Е.Л. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 55–66. doi: 10.15789/2220-7619-MIM-2009

Citation:
Toptygina A.P., Afridonova Z.E., Zakirov R.Sh., Semikina E.L. Maintaining immunological memory to the SARS-CoV-2 virus during COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 55–66. doi: 10.15789/2220-7619-MIM-2009

© Топтыгина А.П. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MIM-2009

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

MAINTAINING IMMUNOLOGICAL MEMORY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS DURING COVID-19 PANDEMIC

Toptygina A.P.[a,c], Afridonova Z.E.[a], Zakirov R.Sh.[b], Semikina E.L.[b]

[a] *G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*
[b] *Federal State Autonomous Institution "National Medical Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*
[c] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*
[d] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The question on the duration and effectiveness of post-infection vs post-vaccination SARS-CoV-2 immunity remains in the focus of numerous studies. The aim of the work was to examine the duration of maintained post-infection and post-vaccination SARS-CoV-2 immunity as well as formation of hybrid (vaccination after infection) and breakthrough (repeated disease or disease after vaccination) immunity in the context of an ongoing COVID-19 pandemic. 107 adults with mild or moderate COVID-19 3–18 months after the disease and 30 subjects vaccinated twice with the Sputnik V vaccine were examined 1–6 times. Antibodies against SARS-CoV-2 virus were determined by ELISA on the "SARS-CoV-2-IgG quantitative-ELISA-BEST" test systems. The antibody avidity was measured by additional incubation with and without denaturing solution. Mononuclear cells were isolated from blood by gradient centrifugation, incubated with and without coronavirus S-protein for 20 hours, stained with fluorescently labeled antibodies, and the percentage of $CD8^{high}CD107a^{+}$ was counted using FACSCanto II cytometer. It was shown that in the group of convalescent and vaccinated subjects, the level of virus-specific antibodies decreased more deeply in individuals with initially high humoral response, but 9 months later the decrease slowed down and reached a plateau. The antibody avidity rose up to 50% and persisted for 18 months. Cellular immunity in recovered patients did not change for 1.5 years, while in vaccinated patients it gradually decreased 6 months later, but remained at detectable level. After revaccination, a significant increase in the level of antibodies, avidity up to 67.6% and cellular immunity returned to the initial level were noted. Hybrid immunity turned out to be significantly higher than post-infection and post-vaccination immunity. The level of antibodies increased to 1218.2 BAU/ml, avidity — to 69.85%, and cellular immunity — to 9.94%. Breakthrough immunity was significantly higher than that after the first disease. The level of antibodies rose to 1601 BAU/ml, avidity — up to 81.6%, cellular immunity — up to 13.71%. Using dynamic observation of four COVID-19 convalescents, it has been shown that in the context of the ongoing pandemic and active coronavirus mutation, natural boosting occurs both asymptomatically and as a result of a mild re-infection, which prevents disappearance of SARS-CoV-2 humoral and cellular immunity.

Key words: *COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies, vaccination, hybrid immunity, cellular immunity, breakthrough immunity.*

Вспышка неизвестного ранее заболевания, вызванная новым коронавирусом, названным SARS-CoV-2, в Ухане в декабре 2019 г., обернулась пандемией COVID-19. Поскольку это была новая коронавирусная инфекция, в начале пандемии отсутствовали тест-системы как для определения самого вируса, так и антител против него. Экстренная разработка и использование «сырых» тест-систем приводили к парадоксальным заявлениям о том, что IgG-антитела появляются раньше, чем IgM, или что антитела исчезают спустя 1–2 месяца после начала заболевания [28]. По мере повышения качества тест-систем эти «открытия» потеряли актуальность, однако возник вопрос о сопоставлении результатов многих десятков, если не сотен тест-систем, выраженных в разных единицах [2, 18]. Эта проблема была решена с введением единиц измерения антител на основе единого стандарта: BAU/мл (Biding Antibody Units; First WHO International Standard for anti-SARS-CoV immunoglobulin (human), NIBSC code: 20/136). Однако даже хорошо налаженная система тестирования не позволяет ответить на вопрос, сколько человек перенесло COVID-19. По данным ВОЗ эта цифра составляет более 550 млн человек. Тем не менее независимые исследования приводят к выводу, что уже в начале 2022 г. около половины населения Земли перенесла это заболевание [21]. Вопрос о продолжительности и эффективности натурального иммунитета (полученного в результате инфекции) остается в центре изучения многими исследователями [19, 27, 34]. Первоначально сообщалось о поддержании иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в течение 6 [38], 9 и более месяцев [6, 15, 25]. Появление в 2021 г. сразу нескольких вакцин против вируса SARS-CoV-2 вызвало всплеск исследований поствакцинального иммунитета [3, 4, 17, 21]. Появившиеся сообщения о быстром истощении поствакцинального иммунитета в считанные месяцы потребовало введения бустерных доз вакцины [14, 20, 32]. При этом сам вирус SARS-CoV-2 постоянно мутировал, вызывая резкие подъемы заболеваемости в мире за счет α-, β-, γ-, δ- и о-вариантов. Было показано, что омикрон способен «прорывать» имевшийся иммунитет к коронавирусу [10].

В связи с вышеизложенным, целью работы было исследование продолжительности под-

держания постинфекционного и поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, а также формирования гибридного (вакцинация после перенесенного заболевания) и прорывного (повторное заболевание или заболевание после вакцинации) иммунитета в условиях продолжающейся пандемии.

Материалы и методы

В исследование были включены 107 взрослых (возраст 18–73 года), перенесших COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, имевших медицинское заключение о перенесенном заболевании, подтвержденное положительным ПЦР-анализом на вирус SARS-CoV-2, спустя 3–18 месяцев после заболевания, и 30 человек, привитых двукратно вакциной «Спутник V». Эти люди были обследованы от 1 до 6 раз на наличие антител к вирусу SARS-CoV-2 и клеточный иммунитет к нему. Исследования проводили с декабря 2020 г. по апрель 2022 г. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 58), обследованные подписывали информированное согласие. Биологический материал получали из локтевой вены в две вакуумные пробирки в объеме 4 мл каждая: с гепарином — для исследования клеточного иммунитета и с активатором свертывания и гелем — для выделения сыворотки крови для оценки гуморального иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Сыворотку крови, полученную центрифугированием разливали в пробирки типа эппендорф и хранили при –70°C до исследования. Антитела, специфичные к вирусу SARS-CoV-2 определяли иммуноферментным методом с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Авидность антител определяли, используя тот же набор в нашей модификации, поскольку нет сертифицированного набора для определения авидности антител к антигенам вируса SARS-CoV-2. Для этого каждую исследуемую сыворотку вносили в лунки двух соседних стрипов. После инкубации и отмывки лунок, согласно протоколу производителя, в лунки первого стрипа добавляли 200 мкл физиологического раствора, в лунки второго стрипа добавляли 200 мкл денатурирующего раствора мочевины и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем отмывали троекратно. Растворы были взяты из набора для определения авидности антител к кори «Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» (Euroimmun, Германия), а время инкубации — из инструкции к этому набору. Затем выполняли все процедуры согласно протоколу к набору «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ».

Выделение мононуклеаров периферической крови проводили в стерильных условиях на градиенте плотности (ρ = 1,077; ООО «ПанЭко», Россия) и отмывали от тромбоцитов. Суспензию клеток в среде RPMI-1640 с добавлением 2мМ L-глютамина, гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко», Россия) вносили в количестве 3×10^5 в лунки 96-луночной стерильной панели, добавляли раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100 (контрольная проба), конечный объем в лунке составил 200 мкл. В опытной пробе делали все то же самое, но использовали лунки 96-луночной панели от набора для определения антител к S-белку вируса методом ИФА «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия), где на дно лунок сорбирован тример S-белка коронавируса, согласно инструкции производителя. Перед началом эксперимента лунки от ИФА-набора были простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения 30 мин. Подготовленные пробы инкубировали 20 ч при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO_2, затем переносили в пробирки для цитофлуорометрии, отмывали раствором CellWash (300g 5 мин) и окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 мин в темноте при 4°C. После повторной отмывки в тех же условиях, проводили иммунофенотипирование с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). Выделяли гейт лимфоцитов высокоэкспрессирующих антиген CD8 ($CD8^{high}$), а в нем определяли процент клеток $CD8^{high}CD107a^+$, представляющих собой цитотоксические Т-лимфоциты, распознавшие S-белок коронавируса и ответившие на такое распознавание атакой с помощью цитотоксических гранул. Границей между отсутствием и наличием специфического клеточного иммунитета считали уровень 1%.

Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке. Было проведено исследование на нормальность распределения методом Колмогорова–Смирнова. Количество антител выражали в BAU/мл. Уровень антител представлен в виде медианы (1–3 квартиль). Для вычисления авидности антител значение в первой лунке (инкубация с физиологическим раствором) принимали за 100%, и вычисляли процент для значения во второй лунке (инкубация с денатурирующим раствором). Результаты расчета авидности и оценки клеточного иммунитета представлены в виде средней арифметической и ее ошибки (M±SE). Корреляции оценивали методом Пирсона. Различия при $p < 0,05$ считали значимыми.

Результаты

При поперечном исследовании когорты переболевших COVID-19 были получены следующие результаты: через 3 мес. от начала заболевания медиана уровня антител в сыворотке крови была 978 (336–1592) BAU/мл, через 6 мес. — 883 (335–1323) BAU/мл, через 9 мес. — 672 (276–1009) BAU/мл и через 12 мес. — 560 (189–867) BAU/мл. Из приведенных результатов видно, что уровень антител со временем постепенно снижался, но даже через год оставался достаточно высоким. Следует отметить, что на момент исследования защитным уровнем считали 150 BAU/мл, а потом 300 BAU/мл, то есть средний уровень антител можно было расценить как защитный даже через год после заболевания.

В продольное исследование когорты переболевших COVID-19 были включены 38 человек, которые были обследованы 3–6 раз через 3–18 мес. от начала заболевания. По уровню антител в сыворотке крови удалось выделить группу с высоким уровнем антител к вирусу SARS-CoV-2 (23 человека — 60,5%) и низким уровнем таких антител (15 человек — 39,5%). Полученные результаты представлены на рис. 1А. Из рисунка видно, что в группе с высоким уровнем IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2 средний уровень составил 1586 (1154–1896) BAU/мл. В сроке от 3 до 9 месяцев после начала заболевания снижение антител было более выражено, а затем этот процесс замедлился. В группе с низким уровнем антител (390 (269–434) BAU/мл) наблюдалась аналогичная тенденция, а на сроке 1 год от заболевания уровень антител вышел на плато. Различия между группами были значимыми ($p < 0,05$). На рис. 1Б представлена авидность антител к вирусу SARS-CoV-2 на тех же сроках исследования. Из рисунка видно, что авидность нарастала с течением времени с 29,7% в 3 мес. до 50% в 12 мес. и оставалась на этом уровне в следующие полгода. Авидность антител не коррелировала с уровнем антител против вируса SARS-CoV-2.

Оценка клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 (табл. 1) позволила также выделить группу с высоким уровнем 10,19±0,93% (20 человек — 52,6%) и низким уровнем 3,9±0,37% (18 человек — 47,4%) ответа.

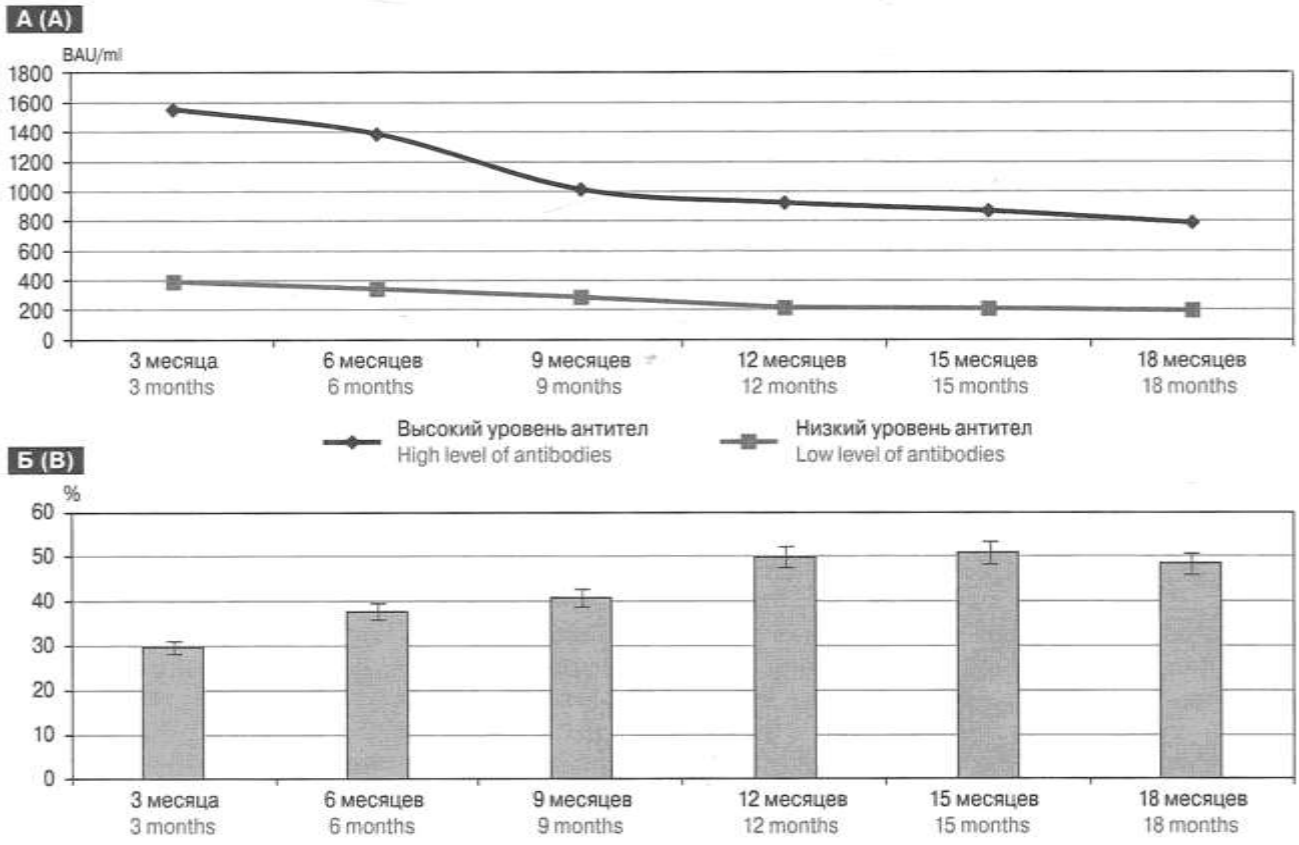


Рисунок 1. Гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19

Figure 1. Humoral immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein in COVID-19 convalescents

Примечание. А. Изменение уровня IgG-антител в зависимости от времени, прошедшего после заболевания. Б. Изменение авидности антител в зависимости от времени, прошедшего после заболевания.

Note. A. Change in the level of IgG antibodies depending on the time after the disease. B. Change in antibody avidity depending on the time after the disease.

Таблица 1. Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от $CD8^{hi}$) к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19 при продольном исследовании когорты (M±SE)

Table 1. Longitudinal cohort study assessing cellular immunity (percentage of $CD8^{hi}CD107a^{+}$ out of $CD8^{hi}$ PBMCs) to SARS-CoV-2 virus S-protein after COVID-19 disease (M±SE)

	Через 3 мес. After 3 months	Через 6 мес. After 6 months	Через 9 мес. After 9 months	Через 12 мес. After 12 months	Через 15 мес. After 15 months	Через 18 мес. After 18 months
Высокий уровень High level	10,19±0,93	10,63±0,97	10,15±0,88	10,05±0,85	10,82±1,01	10,54±0,95
Низкий уровень Low level	3,9±0,37	4,63±0,47	4,4±0,43	3,85±0,39	4,1±0,39	4,15±0,41

Разделение на группы провели на уровне 6%, различия между группами были статистически значимыми ($p < 0,05$). Интересно, что на протяжении 1,5 лет наблюдения уровни клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 не менялись, тогда как уровни антител у тех же людей за это время значимо снизились.

При обследовании 30 человек, не болевших прежде COVID-19 и дважды привитых вакциной «Спутник V», также удалось выделить группу с высоким (1563 [840–1825]) BAU/мл — 16 человек (53,3%) и низким (432 [293–456]) BAU/мл — 14 человек (46,7%) — уровнем антител к вирусу SARS-CoV-2, различия по уровню антител были статистически значимыми ($p < 0,05$). У привитых наблюдалась тенденция, аналогичная переболевшим COVID-19. В группе с высоким уровнем антител снижение этого уровня происходило более выражено, чем в группе с исходно низким уровнем антител, а после 9 месяцев в обеих группах уровень антител выходил на плато (рис. 2А). На рис. 2Б представлена авидность антител у привитых. Из рисунка видно, что авидность антител нарастала с 32,5% через 3 мес. после прививки до 47,3% через 1 год после прививки. В группе привитых авидность также не коррелировала с уровнем антител к вирусу SARS-CoV-2.

Через 12 мес. после первичной вакцинации 23 человека из этой группы были ревакцинированы «Спутник Лайт». Через 3 мес. после этого уровень антител в группе с исходно высоким уровнем возрос с 771 до 1368 BAU/мл, а в группе с исходно низким уровнем — с 156 до 476 BAU/мл. При этом авидность, независимо от уровня антител, повысилась с 47,3 до 67,6% (см. рис. 2). Различия, как по уровням антител, так и по авидности до и после ревакцинации, оказались значимыми ($p < 0,05$).

Анализируя клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых вакциной «Спутник V» (табл. 2), выделили группу с высоким уровнем 11,19±1,03% — 17 человек (56,7%) и низким уровнем 4,41±0,42% ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2 — 13 человек (43,3%), различия между группами были значимыми ($p < 0,05$). Уровень клеточного иммунитета в группе привитых постепенно снижался в течение года после вакцинации и на сроках в 9 и 12 мес. значимо отличался от исходного уровня ($p < 0,05$), однако держался на детектируемом уровне и не исчезал даже в группе с исходно низким уровнем ответа. Через 3 мес. после ревакцинации «Спутник Лайт» уровень клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 значимо возрос в обеих группах ($p < 0,05$), по сравнению с уровнем до ревакцинации, в группе с высоким уровнем с 7,67±0,80 до 10,98±0,97%, а с низким уровнем — с 3,24±0,33 до 5,19±0,41%, и значимо не отличался от уровня через 3 мес. после первой вакцинации.

Из группы переболевших COVID-19, находившихся под наблюдением, 27 человек были дважды привиты вакциной «Спутник V» через 6–12 мес. после заболевания. Формирующийся в таких случаях иммунитет принято называть гибридным, поскольку первичный иммунный ответ формировался на дикий штамм вируса, а вторичный ответ — на вакцинный штамм. На рис. 3А сопоставлены уровни антител в группе 30 привитых (707,7 BAU/мл), и 27 переболевших COVID-19 (972,6 BAU/мл), а также у этих же 27 человек через 3 мес. после вакцинации «Спутник V» (1218,2 BAU/мл). Также показано изменение уровня авидности. У привитых и переболевших эти уровни не превышали 50%, тогда как в группе с гибридным иммунитетом авидность возросла до 69,85%. Различия в уровне антител и авидности до и после вакцинации оказались значимыми ($p < 0,05$).

На рис. 3Б представлены соответствующие результаты по оценке клеточного иммунитета. Из рисунка видно, что поствакцинальный и постинфекционный клеточный иммунитет в этих группах практически не различались (7,77±0,68 и 8,20±0,73%), тогда как гибридный иммунитет оказался значимо выше — 9,94±0,75% ($p < 0,05$).

Из группы переболевших COVID-19 в 2020–2021 гг. 32 человека повторно переболели COVID-19 (штамм омикрон) в январе–феврале 2022 г. У них также был исследован гумораль-

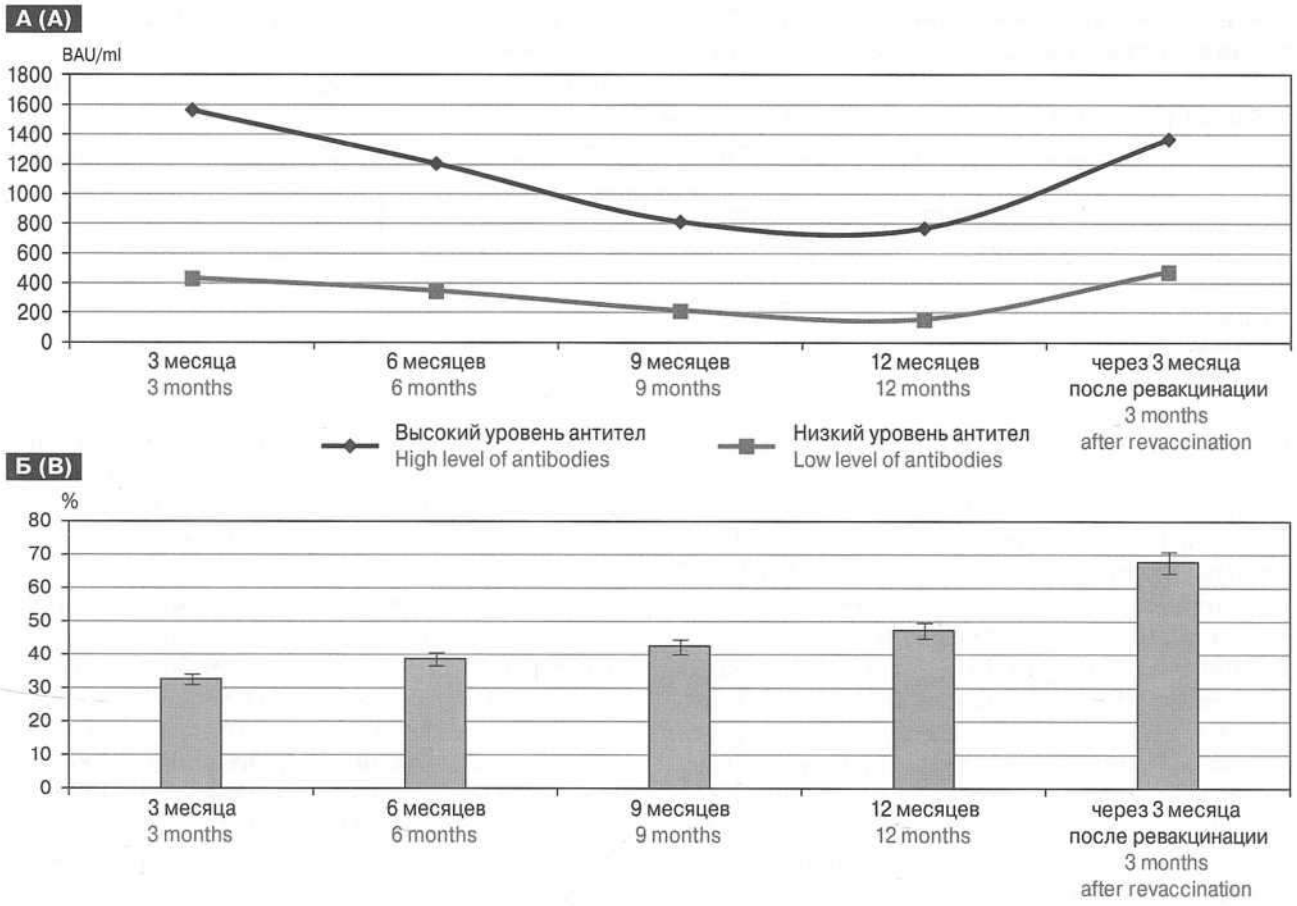


Рисунок 2. Гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых «Спутник V»

Figure 2. Humoral immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein in "Sputnik V" vaccinated subjects

Примечание. А. Изменение уровня IgG-антител в зависимости от времени, прошедшего после прививки. Б. Изменение авидности антител в зависимости от времени, прошедшего после прививки.

Note. A. Change in IgG antibody level depending on the time after vaccination. B. Changing in antibody avidity depending on the time after vaccination.

ный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 (рис. 4А). Такой вид иммунитета принято называть прорывным, поскольку новый штамм вируса «прорвал» иммунную защиту, сформированную после первого заболевания. Из рисунка видно, что в этой группе переболевших сохранялся достаточно высокий уровень антител к вирусу SARS-CoV-2 (719 BAU/мл). Однако штамм омикрон сильно отличается от предыдущих штаммов, поэтому способен преодолеть иммунную защиту. После повторного заболевания COVID-19, которое протекало в легкой форме, уровень антител значимо возрос до 1601 BAU/мл ($p < 0,05$). Авидность антител также значимо возросла с 50 до 81,6% ($p < 0,05$).

При сопоставлении постинфекционного и прорывного клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 (рис. 4Б) видно, что прорывной клеточный иммунитет (13,71±1,07%) в той же группе обследованных значимо превышает ($p < 0,05$) клеточный иммунитет, возникший после первого заболевания (8,38±0,83%).

Следует отметить, что все описанные в данной статье исследования гуморального и клеточного иммунитета к новому коронавирусу проводили на фоне продолжавшейся пандемии COVID-19. Вирус SARS-CoV-2 не только свободно циркулировал в популяции, но и активно мутировал, что приводило к естественному бустированию и повторным заболеваниям, поэтому нельзя с точностью сказать, как долго поддерживался бы иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 при отсутствии циркуляции возбудителя. В качестве примера, подтверждающего эту мысль, приведем результаты динамического наблюдения за четырьмя переболевшими COVID-19 в сентябре 2020 г. Реконвалесценты № 1 и № 2 перенесли инфекцию средней тяжести, а реконвалесценты № 3 и № 4 — в легкой форме. Через 3 мес. после начала заболевания (декабрь 2020 г.) реконвалесценты № 1, № 2 и № 3 сформировали IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 высокого уровня, а реконвалесцент № 4 — низкого (214 BAU/мл), но защитного уровня, поскольк-

ку на тот момент защитным уровнем считали 150 BAU/мл (рис. 5А). Еще через 3 мес., в марте 2021 г., у всех наблюдаемых лиц отмечено снижение уровня антител разной степени выраженности. В мае 2021 г. реконвалесцент № 1 имел контакт без каких-либо клинических проявлений с заболевшим COVID-19 средней тяжести, и в июне 2021 г. мы видим на графике повышение уровня антител — бессимптомное бустирование. Реконвалесцент № 3 также в мае совместно проживал и ухаживал за заболевшим COVID-19 родственником, и в июньском тесте видно резко выраженное бустирование, также протекавшее бессимптомно. Реконвалесцент № 2 контактов не имел, и уровень его антител продолжал снижаться, а реконвалесцент № 4 имел контакт с ин-

Таблица 2. Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от $CD8^{hi}$) к S-белку вируса SARS-CoV-2 после первой прививки «Спутник V» и у ревакцинированных (M±SE)

Table 2. Cellular immunity (percentage of $CD8^{hi}CD107a^{+}$ from $CD8^{hi}$) to SARS-CoV-2 virus S-protein after the first "Sputnik V" vaccination and in revaccinated subjects (M±SE)

	Через 3 мес. After 3 months	**Через 6 мес.** After 6 months	**Через 9 мес.** After 9 months	**Через 12 мес.** After 12 months	**Через 3 мес. после ревакцинации** 3 months after revaccination
Высокий уровень High level	11,19±1,03	9,92±0,94	8,38±0,91*	7,67±0,80*	10,98±0,97#
Низкий уровень Low level	4,41±0,42	3,9±0,40	3,3±0,38*	3,24±0,33*	5,19±0,41#

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с уровнем через 3 месяца после прививки; #p < 0,05 по сравнению с уровнем перед ревакцинацией.
Note. *p < 0.05 compared to the level 3 months after vaccination; #p < 0.05 compared to the level before revaccination.

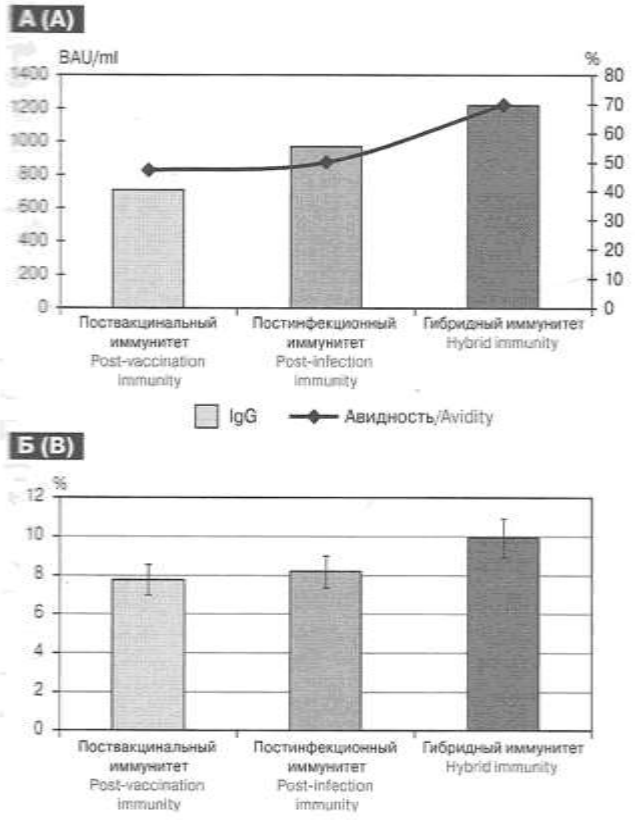


Рисунок 3. Сопоставление поствакцинального, постинфекционного и гибридного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2

Figure 3. Comparison of post-vaccination, post-infection and hybrid immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein

Примечание. А. Гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. Б. Клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Note. A. Humoral immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein. B. Cellular immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein.

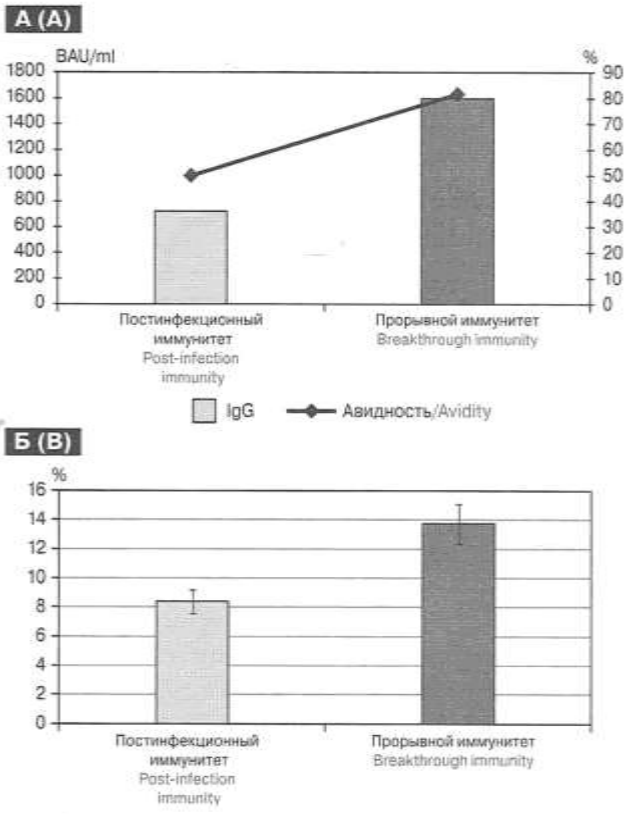


Рисунок 4. Сопоставление постинфекционного и прорывного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2

Figure 4. Comparison of post-infection and breakthrough immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein

Примечание. А. Гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. Б. Клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Note. A. Humoral immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein. B. Cellular immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein.

фицированными, и у него тоже выявлен подъем антител со 120 до 164 BAU/мл. Далее у всех четырех наблюдаемых в отсутствии контактов с вирусом снова было отмечено снижение уровня антител. У реконвалесцента № 3 с декабря 2021 г уровень антител вышел на плато, реконвалесцент № 4 в ноябре 2021 г. перенес повторное заболевание в легкой форме, вызванное δ-штаммом коронавируса, и ответил резким подъемом антител до 668 BAU/мл. У контактировавшего с ним реконвалесцента № 1 отмечено бессимптомное бустирование, а у реконвалесцента № 2, также имевшего контакт с № 4, уровень антител практически не изменился. В начале февраля 2022 г. реконвалесцент № 1 перенес в легкой форме повторное заболевание, вызванное штаммом омикрон, и ответил подъемом уровня антител до 2826 BAU/мл. Контактировавший с ним реконвалесцент № 2 также переболел в легкой форме, уровень его антител возрос с 555 до 668 BAU/мл. Реконвалесцент № 4 также контактировал с заболевшими и продемонстрировал бессимптомный бустер-эффект до 720 BAU/мл. Клеточный иммунитет этих четырех наблюдаемых вел себя несколько иначе (рис. 5Б). Прежде всего обращает на себя внимание, что у реконвалесцента № 3 клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 вообще не сформировался. У реконвалесцента № 1 уровень клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 прогрессивно нарастал с 10,05% в декабре 2020 г. до 18,26% в декабре 2021 г., по-видимому, из-за повторных встреч с вирусом и снизился до 9,19% после заболевания, вызванного штаммом омикрон. У наблюдаемых № 2 и № 4 отмечен резкий подъем уровня клеточного иммунитета после контакта с δ-штаммом коронавируса. Интересно, что у реконвалесцента № 2 уровень клеточного иммунитета продолжил подниматься и после перенесенного заболевания, вызванного штаммом омикрон, достиг уровня 28,54%, а у наблюдаемого № 4, наоборот, после контакта с этим штаммом клеточный иммунитет снизился с 26,29 до 12,86%.

Обсуждение

В нашем исследовании было показано, что у переболевших COVID-19 уровень IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 постепенно снижается, при этом у тех, кто сформировал высокий уровень антител такое снижение идет

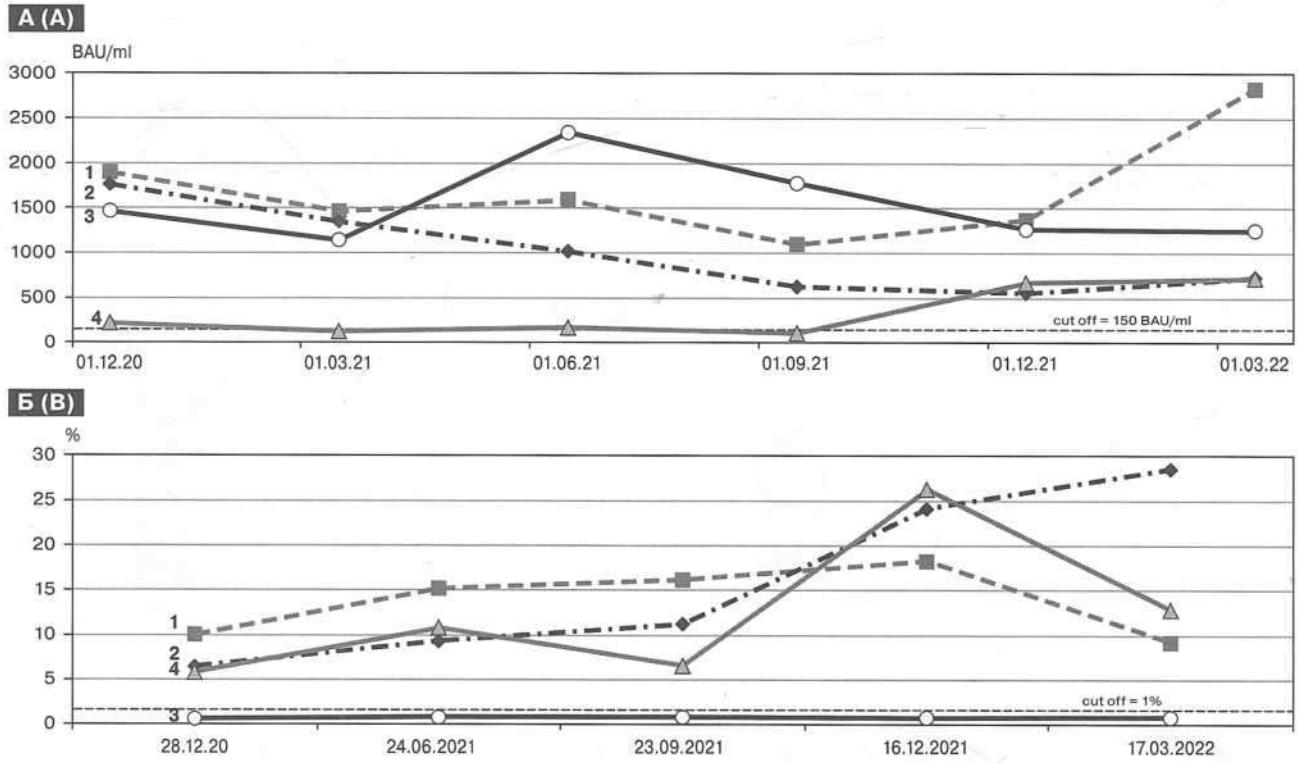


Рисунок 5. Сопоставление динамики иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у четырех человек, перенесших COVID-19 в сентябре 2020 г.

Figure 5. Comparison time-dependent immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein in four convalescent COVID-19 subjects in September 2020

Примечание. А. Гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2. Б. Клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Note. A. Humoral immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein. B. Cellular immunity to SARS-CoV-2 virus S-protein.

интенсивнее, чем в группе с низким уровнем гуморального ответа. Тем не менее на сроке после 9 мес. от перенесенного заболевания такое снижение замедляется, и уровень антител выходит на плато, а не исчезает совсем, как думали ранее. Аналогичные результаты были получены и другими группами исследователей [1, 25, 36], что подтверждает не случайность такого хода событий. Интересно, что авидность антител возрастала до 50% и оставалась на этом уровне без дополнительной антигенной стимуляции. Важно, что уровень клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 практически не менялся в течение 1,5 лет после перенесенного заболевания. Это свидетельствует о том, что поддержание гуморального и клеточного звена иммунологической памяти происходит независимо друг от друга.

В группе вакцинированных «Спутник V» динамика гуморального иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 была сопоставима с таковой у переболевших, а клеточный ответ значимо снижался на сроках более 6 мес. от вакцинации, хотя и не исчезал совсем. В западной литературе на примере вакцин, произведенных фирмами «Pfizer» и «Moderna», показано, что после вакцинации формируются только короткоживущие плазмоциты, поэтому после высокого подъема уровня антител после прививки этими вакцинами, возникает достаточно быстрый его спад [29, 37]. Однако эти вакцины основаны на мРНК-технологии, тогда как «Спутник V» — это векторная вакцина, она в большей степени имитирует вирусную атаку. Исследования, посвященные продолжительности поствакцинального иммунитета у привитых «Спутник V», выявляли высокий уровень IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 спустя 6 и более месяцев после прививки [1, 4]. Ревакцинация через 12 мес. после первичной вакцинации индуцировала значимый подъем уровня антител и их авидности до 67,6%, что отмечали и другие исследователи [1]. Уровень клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 значимо возрос после ревакцинации и вернулся к изначальному уровню.

При изучении формирования гибридного иммунитета (вакцинация ранее переболевших людей) выявлен значимый подъем уровня антител, их авидности и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [1, 9, 15]. Более того, на примере вакцин на основе мРНК было показано, что снижение уровня антител при гибридном иммунитете идет существенно медленнее, чем у привитых, что обусловлено, по-видимому, наличием также и долгоживущих плазмоцитов после перенесенного заболевания [15, 26]. Уровень клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 при гибридном иммунитете также оказался значимо выше, чем при поствакцинальном и постинфекционном. Похожие результаты были показаны при оценке гибридного иммунитета на основе мРНК-вакцин [30, 31], хотя способ оценки клеточного иммунитета был несколько иной.

Формирование прорывного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 связано с активными мутациями коронавируса от Уханьского штамма, с которого все началось, через B.1.1.7 (альфа), B.1.351 (бета), P.1 (гамма), B.1.617.2 (дельта) вплоть до омикрона B.1.1.529, и далее, поскольку у омикрона уже насчитывается 5 вариантов (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 и BA.5), а также появился BA.2,75, несущий мутации штаммов омикрона и дельты. Изменение структуры S-белка вируса SARS-CoV-2 в результате этих мутаций привело к «прорыву» сформированного иммунитета у переболевших или вакцинированных и повторным заболеваниям COVID-19 [13]. Несмотря на то что предшествующие вакцинация или инфекция формируют высокий уровень антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, штамму омикрон удается избегать их нейтрализующего действия [7, 8, 12, 33]. Выявленное нами резкое повышение уровня антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 при прорывном иммунитете означает, что уровня предсуществовавших антител не хватило для отражения атаки вирусов штамма омикрона и свидетельствует о дополнительном включении механизмов формирования антител на мутировавший S-белок. Повышение авидности антител также свидетельствует о дополнительных перестройках в антигенраспознающих участках антител, что говорит о формировании дополнительных плазмоцитов в зародышевых центрах при прорывном иммунитете, помимо тех, которые сформировались при первом заболевании.

Уровень клеточного иммунитета к коронавирусу определяет тяжесть заболевания [22]. Т-клетки распознают короткие антигенные пептиды, поэтому клеточный иммунитет в меньшей степени ограничен мутациями вируса, чем гуморальный. $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоциты привитых и ранее переболевших перекрестно распознают S-белок штамма омикрон в 70–90% случаев [11, 16], однако далеко не у всех пациентов [23]. Наши результаты, выявившие резкий подъем уровня клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 при прорывном иммунитете подтверждают эти наблюдения. Такой подъем происходит, по-видимому, за счет перехода субдоминантных и даже минорных клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, сформировавшихся на первое инфицирование, в разряд доминантных при повторной инфекции [5].

Приведенные результаты динамического наблюдения в течение 1,5 лет за четырьмя

людьми, перенесшими COVID-19 в сентябре 2020 г., свидетельствуют, что как гуморальный, так и клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 формируется на индивидуальном уровне от полного отсутствия до очень высокого и независимо друг от друга, что связано, по-видимому, с индивидуальными особенностями формирования иммунитета. Этот уровень на фоне продолжающейся пандемии может снижаться или повышаться за счет бессимптомного бустирования или повторного заболевания, но продолжающаяся циркуляция дикого вируса и его различных штаммов не позволяет иммунитету к коронавирусу снизиться до нуля. Поэтому точные данные о продолжительности поддержания гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 можно будет получить только в результате длительного наблюдения после завершения пандемии. Так в литературе есть данные, что антитела и клеточный иммунитет к вирусу SARS-CoV-1 определялись в крови переболевших более 6 лет в условиях отсутствия циркуляции вируса [24, 35].

Таким образом, проведенные исследования показали, что как гуморальный, так и клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 сохраняется у переболевших и привитых более года. Уровень иммунитета может снижаться в первые полгода, однако затем выходит на плато и сохраняется, по крайней мере, 1,5 года у переболевших и 1 год у привитых. Уровень гуморального и клеточного иммунитета различается у разных людей, независимо от того, были ли они привиты или переболели. В условиях продолжающейся пандемии и активной циркуляции дикого вируса происходит естественное бустирование, что препятствует снижению как гуморального, так и клеточного иммунитета. Дополнительную стимуляцию оказывает процесс активных мутаций вируса и смены штаммов, что приводит к повторному инфицированию, протекающему в легкой или бессимптомной форме, но также приводящему к бустированию. Уровень гибридного и, особенно, прорывного иммунитета, как гуморального, так и клеточного, оказался достоверно выше, чем уровень поствакцинального или постинфекционного (на первичную инфекцию) иммунитета, что дает основание надеяться, что если не возникнет какого-то уж очень отличного от других штамма коронавируса, пандемия будет завершена и коронавирусная инфекция сойдет на уровень сезонных простуд.

Список литературы/References

1. Андреев И.В., Нечай К.О., Андреев А.И., Зубарева А.П., Есаулова Д.Р., Аленова А.М., Николаева И.А., Чернявская О.П., Ломоносов К.С., Шульженко А.Е., Курбачева О.М., Латышева Е.А., Шартанова Е.В., Назарова Е.В., Романова Л.В., Черченко Н.Г., Смирнов В.В., Аверков О.В., Мартынов А.И., Вечорко В.И., Гудима Г.О., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Поствакцинальный и постинфекционный гуморальный иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2 // Иммунология. 2022. Т. 43, № 3. С. 18–32. [Andreev I.V., Nechay K.O., Andreev A.I., Zubareva A.P., Esaulova D.R., Alenova A.M., Nikolaeva I.A., Chernyavskaya O.P., Lomonosov K.S., Shulzhenko A.E., Kurbacheva O.M., Latysheva E.A., Shartanova E.V., Nazarova E.V., Romanova L.V., Cherchenko N.G., Smirnov V.V., Averkov O.V., Martynov A.I., Vechorko V.I., Gudima G.O., Kudlay D.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Post-vaccination and post-infection humoral immune response to the SARS-CoV-2 infection. *Immunologiya = Immunologiya, 2022, vol. 43, no. 3, pp. 18–32. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0206-4952-2022-43-1-18-32*
2. Белякова В.В., Майорова О.А., Иванова Н.В., Степанова И.Е., Смердова М.А., Обрядина А.П., Топтыгина А.П. Оценка серологических тестов на антитела к различным антигенам вируса SARS-CoV-2. Сопоставление шести тест-систем // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 6. С. 1395–1404. [Belyakova V.V., Maiorova O.A., Ivanova N.V., Stepanova I.E., Smerdova M.A., Obryadina A.P., Toptygina A.P. Assessment of serological tests for antibodies to different antigens of the SARS-CoV-2 virus: comparison of six immunoassays. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2021, vol. 23, no. 6, pp. 1395–1404. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2228*
3. Драпкина О.М., Бернс С.А., Горшков А.Ю., Шишкова В.Н., Рыжакова Л.Н., Литинская О.А., Иванова А.А., Веретенникова А.В., Башняк В.С., Татаревич Е.Ю. Отдаленная динамика уровня специфических IgG-антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2 у вакцинированных лиц // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021. Т. 20, № 8. С. 23–28. [Drapkina O.M., Berns S.A., Gorshkov A.Yu., Shishkova V.N., Ryzhakova L.N., Litinskaya O.A., Ivanova A.A., Veretennikova A.V., Bashnyak V.S., Tatarevich E.Yu. Long-term dynamics of the levels of anti-SARS-CoV-2 S-protein IgG antibodies in vaccinated individuals. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention, 2021, vol. 20, no. 8, pp. 23–28. (In Russ.)*] *doi: 10.15829/1728-8800-2021-3124*
4. Петрова О.В., Твердохлебова Д.К. Наличие и количество антител после вакцинации «Гам-Ковид-Вак» // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 3. С. 147–150. [Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K. Presence and quantity of antibodies after vaccination "Gam-COVID-Vac". *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostic, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 147–150 (In Russ.)*] *doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-3-147-150*
5. Топтыгина А.П. Гетерологичные иммунные ответы в норме и при патологии // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 269–276. [Toptygina A.P. Heterologous immune responses in health and disease. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 269–276. (In Russ.)*]. *doi: 10.15789/2220-7619-HIR-1292*
6. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 495–504. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E. Comparison of the humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 495–504. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809*

7. Altarawneh H.N., Chemaitelly H., Hasan M.R., Ayoub H.H., Qassim S., AlMukdad S., Coyle P., Yassine H.M., Al-Khatib H.A., Benslimane F.M., Al-Kanaani Z., Al-Kuwari E., Jeremijenko A., Kaleeckal A.H., Latif A.N., Shaik R.M., Abdul-Rahim H.F., Nasrallah G.K., Al-Kuwari M.G., Butt A.A., Al-Romaihi H.E., Al-Thani M.H., Al-Khal A., Bertollini R., Tang P., Abu-Raddad L.J. Protection against the omicron variant from previous SARS-CoV-2 infection. *N. Engl. J. Med., 2022, vol. 386, no. 13, pp. 1288–1290. doi: 10.1056/NEJMc2200133*
8. Cameroni E. Bowen J.E., Rosen L.E., Saliba C., Zepeda S.K., Culap K., Pinto D., VanBlargan L.A., De Marco A., di Iulio J., Zatta F., Kaiser H., Noack J., Farhat N., Czudnochowski N., Havenar-Daughton C., Sprouse K.R., Dillen J.R., Powell A.E., Chen A., Maher C., Yin L., Sun D., Soriaga L., Bassi J., Silacci-Fregni C., Gustafsson C., Franko N.M., Logue J., Iqbal N.T., Mazzitelli I., Geffner J., Grifantini R., Chu H., Gori A., Riva A., Giannini O., Ceschi A., Ferrari P., Cippà P.E., Franzetti-Pellanda A., Garzoni C., Halfmann P.J., Kawaoka Y., Hebner C., Purcell L.A., Piccoli L., Pizzuto M.S., Walls A.C., Diamond M.S., Telenti A., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Snell G., Veesler D., Corti D. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature, 2022, vol. 602, pp. 664–670. doi: 10.1038/s41586-021-04386-2*
9. Crotty S. Hybrid immunity. *Science, 2021, vol. 372, pp. 1392–1393. doi: 10.1126/science.abj2258*
10. Danza P., Koo T.H., Haddix M., Fisher R., Traub E., OYong K., Balter S. SARS-CoV-2 infection and hospitalization among adults aged ≥ 18 years, by vaccination status, before and during SARS-CoV-2 B.1.1.529 (omicron) variant predominance — Los Angeles County, California, November 7, 2021 — January 8, 2022. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 2022, vol. 71, pp. 177–181. doi: 10.15585/mmwr.mm7105e1*
11. Gao Y., Cai C., Grifoni A., Müller T.R., Niessl J., Olofsson A., Humbert M., Hansson L., Österborg A., Bergman P., Chen P., Olsson A., Sandberg J.K., Weiskopf D., Price D.A., Ljunggren H.G., Karlsson A.C., Sette A., Aleman S., Buggert M. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nat. Med., 2022, vol. 28, pp. 472–476. doi: 10.1038/s41591-022-01700-x*
12. Garcia-Beltran W.F., St Denis K.J., Hoelzemer A., Lam E.C., Nitido A.D., Sheehan M.L., Berrios C., Ofoman O., Chang C.C., Hauser B.M., Feldman J., Roederer A.L., Gregory D.J., Poznansky M.C., Schmidt A.G., Iafrate A.J., Naranbhai V., Balazs A.B. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell, 2022, vol. 185, pp. 457–466. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.033.*
13. Gazit S., Shlezinger R., Perez G., Lotan R., Peretz A., Ben-Tov A., Herzel E., Alapi H., Cohen D., Muhsen K., Chodick G., Patalon T. SARS-CoV-2 natural acquired immunity vs vaccine-induced immunity, reinfections versus breakthrough infections: a retrospective cohort study. *Clin. Infect. Dis., 2022: ciac262. doi: 10.1093/cid/ciac262*
14. Goldberg Y., Mandel M., Bar-On Y.M., Bodenheimer O., Freedman L., Haas E.J., Milo R., Alroy-Preis S., Ash N., Huppert A. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in Israel. *N. Engl. J. Med., 2021, vol. 385, no. 24: e85. doi: 10.1056/NEJMoa2114228*
15. Goldberg Y., Mandel M., Bar-On Y.M., Bodenheimer O., Freedman L., Ash N., Alroy-Preis S., Huppert A., Milo R. Protection and waning of natural and hybrid immunity to SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med., 2022, vol. 386, no. 23, pp. 2201–2212. doi: 10.1056/NEJMoa2118946*
16. Keeton R., Tincho M.B., Ngomti A., Baguma R., Benede N., Suzuki A., Khan K., Cele S., Bernstein M., Karim F., Madzorera S.V., Moyo-Gwete T., Mennen M., Skelem S., Adriaanse M., Mutithu D., Aremu O., Stek C., du Bruyn E., Van Der Mescht M.A., de Beer Z., de Villiers T.R., Bodenstein A., van den Berg G., Mendes A., Strydom A., Venter M., Giandhari J., Naidoo Y., Pillay S., Tegally H., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Wilkinson R.J., de Oliveira T., Bekker L.G., Gray G., Ueckermann V., Rossouw T., Boswell M.T., Bhiman J.N., Moore P.L., Sigal A., Ntusi N.A.B., Burgers W.A., Riou C. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature, 2022, vol. 603, pp. 488–492. doi: 10.1038/s41586-022-04460-3*
17. Khandker S.S., Godman B., Jawad M.I., Meghla B.A., Tisha T.A., Khondoker M.U., Haq M.A., Charan J., Talukder A.A., Azmuda N., Sharmin S., Jamiruddin M.R., Haque M., Adnan N. A systematic review on COVID-19 vaccine strategies, their effectiveness, and issues. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 9, no. 12: 1387 doi: 10.3390/vaccines9121387*
18. Kohmer N., Westhaus S., Rühа C., Ciesek S., Rabenau H.F. Brief clinical evaluation of six high-throughput SARS-CoV-2 IgG antibody assays. *J. Clin. Virol., 2020, vol. 129: 104480. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104480*
19. Kojima N., Shrestha N.K., Klausner J.D., A systematic review of the protective effect of prior SARS-CoV-2 infection on repeat infection. *Eval. Health Prof., 2021, vol. 44, no. 4, pp. 327–332. doi: 10.1177/01632787211047932*
20. Levin E.G., Lustig Y., Cohen C., Fluss R., Indenbaum V., Amit S., Doolman R., Asraf K., Mendelson E., Ziv A., Rubin C., Freedman L., Kreiss Y., Regev-Yochay G. Waning immune humoral response to BNT162b2 COVID-19 vaccine over 6 months. *N. Engl. J. Med., 2021, vol. 385: e84. doi: 10.1056/NEJMoa2114583*
21. McIntyre P.B., Aggarwal R., Jani I., Jawad J., Kochhar S., MacDonald N., Madhi S.A., Mohsni E., Mulholland K., Neuzil K.M., Nohynek H., Olayinka F., Pitisuttithum P., Pollard A.J., Cravioto A. COVID-19 vaccine strategies must focus on severe disease and global equity. *Lancet, 2022, vol. 399, pp. 406–410. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02835-X*
22. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol., 2022, vol. 23, pp. 186–193. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w*
23. Naranbhai V., Nathan A., Kaseke C., Berrios C., Khatri A., Choi S., Getz M.A., Tano-Menka R., Ofoman O., Gayton A., Senjobe F., Zhao Z., St Denis K.J., Lam E.C., Carrington M., Garcia-Beltran W.F., Balazs A.B., Walker B.D., Iafrate A.J., Gaiha G.D. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals. *Cell, 2022, vol. 185, pp. 1041–1051. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.029*
24. Ng O.-W., Chia A., Tan A.T., Jadi R.S., Leong H.N., Bertoletti A., Tan Y.-J. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine, 2016, vol. 34, pp. 2008–2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.063*
25. Nordström P., Ballin M., Nordström A. Risk of SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 hospitalisation in individuals with natural and hybrid immunity: a retrospective, total population cohort study in Sweden. *Lancet Infect. Dis., 2022, vol. 22, no. 6, pp. 781–790. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00143-8*
26. Pape K.A., Dileepan T., Kabage A.J., Kozysa D., Batres R., Evert C., Matson M., Lopez S., Krueger P.D., Graiziger C., Vaughn B.P., Shmidt E., Rhein J., Schacker T.W., Khoruts A., Jenkins M.K. High-affinity memory B cells induced by SARS-CoV-2 infection produce more plasmablasts and atypical memory B cells than those primed by mRNA vaccines. *Cell Rep., 2021, vol. 37: 109823. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109823*

27. Petras M. Highly effective naturally acquired protection against COVID-19 persists for at least 1 year: a meta-analysis. *J. Am. Med. Dir. Assoc., 2021, vol. 22, no. 11, pp. 2263–2265. doi: 10.1016/j.jamda.2021.08.042*
28. Qu J., Wu C., Li X., Zhang G., Jiang Z., Li X., Zhu Q., Liu L. Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis., 2020, vol. 71, no. 16, pp. 2255–2258. doi: 10.1093/cid/ciaa489*
29. Quast I., Tarlinton D. B cell memory: understanding COVID-19. *Immunity, 2021, vol. 54, pp. 205–210. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.014*
30. Reynolds C.J., Pade C., Gibbons J.M., Butler D.K., Otter A.D., Menacho K., Fontana M., Smit A., Sackville-West J.E., Cutino-Moguel T., Maini M.K., Chain B., Noursadeghi M.; UK COVIDsortium Immune Correlates Network, Brooks T., Semper A., Manisty C., Treibel T.A., Moon J.C.; UK COVIDsortium Investigators, Valdes A.M., McKnight Á., Altmann D.M., Boyton R. Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science, 2021, vol. 372, pp. 1418–1423. doi: 10.1126/science.abh1282*
31. Rodda L.B., Morawski P.A., Pruner K.B., Fahning M.L., Howard C.A., Franko N., Logue J., Eggenberger J., Stokes C., Golez I., Hale M., Gale M. Jr., Chu H.Y., Campbell D.J., Pepper M. Imprinted SARS-CoV-2-specific memory lymphocytes define hybrid immunity. *Cell, 2022, vol. 185, pp. 1588–1601 doi: 10.1016/j.cell.2022.03.018*
32. Rosenberg E.S., Dorabawila V., Easton D., Bauer U.E., Kumar J., Hoen R., Hoefer D., Wu M., Lutterloh E., Conroy M.B., Greene D., Zucker H.A. Covid-19 vaccine effectiveness in New York state. *N. Engl. J. Med., 2022, vol. 386, pp. 116–127. doi: 10.1056/NEJMoa2116063*
33. Rossler A., Riepler L., Bante D., von Laer D., Kimpel J. SARS-CoV-2 Omicron variant neutralization in serum from vaccinated and convalescent persons. *N. Engl. J. Med., 2022, vol. 386, pp. 698–700. doi: 10.1056/NEJMc2119236*
34. Shenai M.B., Rahme R., Noorchashm H. Equivalency of protection from natural immunity in COVID-19 recovered versus fully vaccinated persons: a systematic review and pooled analysis. *Cureus, 2021, vol. 13: e19102. doi: 10.7759/cureus.19102*
35. Tang F., Quan Y., Xin Z.T., Wrammert J., Ma M.J., Lv H., Wang T.B., Yang H., Richardus J.H., Liu W., Cao W.C. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J. Immunol., 2011, vol. 186, pp. 7264–7268 doi: 10.4049/jimmunol.0903490*
36. Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Goss C.W., Rauseo A.M., Schmitz A.J., Hansen L., Haile A., Klebert M.K., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature, 2021, vol. 595, no. 7867, pp. 421–425. doi: 10.1038/s41586-021-03647-4*
37. Turner J.S., O'Halloran J.A., Kalaidina E., Kim W., Schmitz A.J., Zhou J.Q., Lei T., Thapa M., Chen R.E., Case J.B., Amanat F., Rauseo A.M., Haile A., Xie X., Klebert M.K., Suessen T., Middleton W.D., Shi P.Y., Krammer F., Teefey S.A., Diamond M.S., Presti R.M., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature, 2021, vol. 596, no. 7870, pp. 109–113. doi: 10.1038/s41586-021-03738-2*
38. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F., Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science, 2020, vol. 370, pp. 1227–1230. doi: 10.1126/science.abd7728*

Авторы:

Топтыгина А.П., д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБО УВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
Афридонова З.Э., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Закиров Р.Ш., врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава РФ, Москва, Россия;
Семикина Е.Л., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. централизованной клинико-диагностической лабораторией ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава РФ, Москва, Россия; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Toptygina A.P., DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;
Afridonova Z.E., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Zakirov R.Sh., Clinical Laboratory Specialist, Centralized Diagnostics Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Semikina E.L., DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Centralized Diagnostics Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.08.2022
Принята к печати 29.11.2022

Received 05.08.2022
Accepted 29.11.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 67–74

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 67–74

ДИНАМИКА МАТУРАЦИИ АВИДНОСТИ IgG-АНТИТЕЛ К RBD SARS-CoV-2 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКА И ТИПА ИММУНИЗАЦИИ

А.М. Кудряшова[1], В.А. Мануйлов[2], А.А. Мурзина[1], А.Н. Каира[1], О.В. Борисова[1]

[1] *ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*
[2] *ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия*

Резюме. Цель исследования — изучение динамики матурации авидности IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 в зависимости от пути иммунизации (вакцинация или перенесенная инфекция), а также от срока и кратности иммунизации. *Материалы и методы.* Исследование было проведено на двух выборках образцов, полученных в разные временные промежутки от начала пандемии COVID-19. Первая выборка (группа № 1) — 87 образцов сывороток крови, полученными от реконвалесцентов, однократно переболевших COVID-19 в период с марта по сентябрь 2020 г. Вторая выборка включала 204 образца, полученных в сентябре 2021 г. у двух групп добровольцев. Группа № 2 (n = 64) — добровольцы, иммунизированные полным курсом Гам-Ковид-Вак, группа № 3 (n = 140) — добровольцы, переболевшие COVID-19 и получившие курс вакцины Гам-Ковид-Вак («гибридный иммунитет»). *Результаты и выводы.* Исследование динамики матурации авидности антител класса G к RBD SARS-CoV-2 в зависимости от способа и кратности иммунизации показало, что наиболее эффективный иммунитет формируется у пациентов, переболевших COVID-19 и вакцинированных полным курсом препарата Спутник V (n = 64). В образцах добровольцев с таким анамнезом было показано не только достоверно более высокое (по сравнению с добровольцами групп № 1 и № 2) количественное содержание IgG (медианный уровень 228 BAU/ml против 75 или 119 BAU/ml, $p < 0,001$), но и более высокий уровень их авидности (ИА 90,5% против 54,5 и 76,6 соответственно, $p < 0,001$, 4М мочевина). В тесте для определения индекса авидности с 8М мочевиной в качестве денатурирующего агента у пациентов с «гибридным иммунитетом» медианный уровень ИА составил 25% против 14,8 и 16% у переболевших и вакцинированных соответственно ($p < 0,001$), и только у 8 пациентов был выше 50%. При сравнении таких способов иммунизации, как перенесенный однократно COVID-19 или вакцинация полным курсом Спутник V, было показано, что вакцинация приводит к более высоким уровням IgG (медианные значения в группах 119 и 75 BAU/ml, $p < 0,001$) и к более высокому индексу их авидности (76,6% против 54,5%). При этом эффективность вакцинации была выраженной уже на ранних стадиях иммунизации (до 4 месяцев) — в период, когда матурация IgG еще не завершена. В этот период вакцинация приводит к выработке антител с ИА уже на медианном уровне 82% против 36% у тех, кто перенес заболевание в тот же срок.

Ключевые слова: *COVID-19, авидность, IgG-антитела, матурация, сыворотки крови человека, ИФА.*

Адрес для переписки:
Кудряшова Александра Михайловна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 674-54-97 (служебн.); 8 903 223-82-50 (моб.).
E-mail: 2238250@rambler.ru

Contacts:
Alexandra M. Kudryashova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-54-97 (office); +7 903 223-82-50 (mobile).
E-mail: 2238250@rambler.ru

Для цитирования:
Кудряшова А.М., Мануйлов В.А., Мурзина А.А., Каира А.Н., Борисова О.В. Динамика матурации авидности IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 в зависимости от срока и типа иммунизации // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 67–74. doi: 10.15789/2220-7619-DIM-2049

Citation:
Kudryashova A.M., Manuylov V.A., Murzina A.A., Kaira A.N., Borisova O.V. Dynamics in maturation of SARS-CoV-2 RBD-specific IgG antibody avidity depending on immunization timeframe and type // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 67–74. doi: 10.15789/2220-7619-DIM-2049

© Кудряшова А.М. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DIM-2049

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DYNAMICS IN MATURATION OF SARS-CoV-2 RBD-SPECIFIC IgG ANTIBODY AVIDITY DEPENDING ON IMMUNIZATION TIMEFRAME AND TYPE

Kudryashova A.M.[a], Manuylov V.A.[b], Murzina A.A.[a], Kaira A.N.[a], Borisova O.V.[a]

[a] *Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

[b] *Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology of the Ministry of health of Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The aim is to examine dynamics of avidity maturation of IgG antibodies against SARS-CoV-2 RBD depending on the type of immunization (vaccination or infection), as well as on the duration and frequency of immunization. *Materials and methods.* The study was performed on two sample cohorts collected at two time points during COVID-19 pandemic. The first cohort (group No. 1) consisted of 87 samples of blood sera obtained from COVID-19 convalescents in the period from March to September 2020. The second cohort included 204 samples obtained in September 2021 from two patient groups. Group No. 2 (n = 64) — patients immunized with a full course of Gam-Covid-Vac, group No. 3 (n = 140) — COVID-19 convalescent patients and subjects vaccinated with Gam-Covid-Vac ("hybrid immunity"). *Results and conclusion.* The dynamics of avidity maturation for SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies depending on the method and frequency of immunization, showed that the most effective immunity was formed in COVID-19 convalescent patients and subjects vaccinated with a full course of Gam-Covid-Vac. The "hybrid" immunity showed not only a significantly higher (compared with groups No. 1 and No. 2) level of IgG antibodies (median 228 BAU/ml vs 75 or 119 BAU/ml, $p < 0.001$), but also a higher level of avidity (IA 90.5% vs 54.5 and 76.6, respectively, $p < 0.001$, 4M urea). In the test for assessing the avidity index with the denaturing agent 8M urea in patients with "hybrid immunity", the median level of IA was 25% versus 14.8% and 16% in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects ($p < 0.001$), only in 8 patients IA was higher than 50%. While comparing a single infection of COVID-19 with a full course of Gam-Covid-Vac, it was shown that vaccination leads to higher IgG levels (median values in groups 119 and 75 BAU/ml, $p < 0.001$) and to a higher avidity index (median 76.6% vs 54.5%). Thus, the more rapid induction of high-avidity antibodies was in vaccinated individuals at early stages of immunization (up to 4 months), during the period when IgG avidity maturation has not yet been completed. Our results showed that during this period vaccination leads to production of antibodies with avidity index at median level of 82% versus 36% in COVID-19 convalescents at similar time point.

Key words: *COVID-19, avidity, IgG antibodies, maturation, human serum, ELISA.*

Введение

В клинической практике авидность антител класса G (IgG) к антигенам различных возбудителей используется для дифференциации первичных и вторичных случаев заражения. Это важно при диагностике инфекций TORCH-комплекса у беременных женщин, поскольку первичное инфицирование соответствующими возбудителями (в частности, вирусом краснухи, ЦМВ [8, 9, 18, 21] во время беременности является опасным для развития плода. При этом в качестве меры авидности обычно используется «индекс авидности» (ИА), пропорциональный доле IgG, сохраняющих способность связываться с антигеном даже при воздействии денатурирующего агента *in vitro* в виду высокой аффинности к мишени [9].

Связь авидности и протективного иммунитета, приобретенного в результате вакцинации или реконвалесценции, была показана в ряде исследований для различных инфекций. Повышенный риск инфицирования для людей, продуцирующих антитела с более низкой авидностью, был показан, например, для ЦМВ-инфекции [1, 10, 12], кори [7], лихорадки денге [17], респираторно-синцитиального вируса [6].

Инициирующей стадией инфицирования вирусом SARS-CoV-2 клетки человека, как известно, является связывание вирусного рецептора RBD с человеческим белком ACE2. Чем выше авидность вируснейтрализующих антител к RBD, тем более эффективно они будут конкурировать с ним за связывание с ACE2 и препятствовать инфицированию клеток [2]. Динамика нарастания (матурация) авидности антител к коронавирусу SARS-CoV-2 исследована в ряде работ, при этом установлена четкая тенденция к увеличению авидности со временем [3, 4, 5, 13, 14]. Показано, что титры образцов плазмы, полученные в классической вирусологической реакции нейтрализации, достоверно коррелируют не только с титром IgG к антигену Spike (на котором расположен RBD), но и с их авидностью [9, 22]. Более того, индекс авидности коррелирует с тяжестью повторного заболевания [15].

Однако серологический ответ на антигены SARS-CoV-2 (будь то нуклеопротеин, Spike, его субъединица S1 или RBD-домен), по ряду данных характеризуется неполной матурацией авидности IgG [2, 19, 20]. На нынешнем этапе пандемии, на фоне многочисленных случаев повторного заболевания COVID-19, при том что осуществляется масштабная вакцинация населения, интерес представляет различие в степени матурации антител класса G к RBD коронавируса SARS-CoV-2 в зависимости от пути

иммунизации (вакцинация или перенесенная инфекция) и его кратности.

Для решения этой задачи в настоящем исследовании был проведен анализ авидности образцов двух выборок, полученных в разные временные промежутки от начала пандемии COVID-19, и отличающихся способами иммунизации.

Материалы и методы

В исследование были включены 87 образцов сывороток крови от реконвалесцентов COVID-19, переболевших в период с марта по сентябрь 2020 г., а также 204 образца, полученные в сентябре 2021 г. от сотрудников специализированного многопрофильного психиатрического стационара ГБУЗ МО «Психиатрическая больница им. В.И. Яковенко», иммунизированных полным курсом вакцины Гам-Ковид-Вак (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава, Россия). Данная выборка была представлена двумя группами: группой пациентов, прошедших вакцинацию Гам-Ковид-Вак, и группой пациентов, имеющих гибридный иммунитет, то есть перенесших заболевание COVID-19 и двухкратно вакцинированных Гам-Ковид-Вак.

Все участники дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.М. Мечникова.

Определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2 и индекса их авидности проводили в наборе реагентов «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» (ООО «МедипалТех», Россия, РУ № РЗН 2021/14424 от 27.05.2021 г.). В данной системе в качестве денатурирующего агента используют 4М раствор мочевины, а имеющими «высокую» авидность, в соответствии с инструкцией производителя, считаются IgG с ИА≥ 50%. Для сравнительного анализа изучения маturации авидности также использовали в качестве денатурирующего раствор 8М мочевины (Panreac, Испания).

Протокол ИФА выполняли согласно инструкции производителя. После 30-минутной инкубации с сывороткой в конечном разведении 1:100 в лунки вносили денатурирующие растворы и контрольный фосфатный буферный раствор на 10 мин. После отмывки инкубировали 30 мин с мышиными моноклональными антителами к Fc-фрагменту IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена. На следующей стадии вносили субстратную буферную смесь на 15 мин, измерение оптической плотности (ОП) производили при 450/620 нм.

Индекс авидности (ИА, %) рассчитывали как отношение ОП лунки с денатурирующим раствором (ОПДР-лунка) к ОП лунки с контрольным буфером, и выражали в процентах (ОПФБ-лунка):

$$\text{ИА} = (\text{ОПДР-лунка}/\text{ОПФБ-лунка}) \times 100\%.$$

Количественное определение антител проводили с использованием стандартного образца ВОЗ (NIBSC code: 20/136) [16]. При этом протокол проведения ИФА был аналогичен описанному выше, но без стадии инкубации с денатурирующим и контрольным буфером. Для построения градуировочной кривой использовали 5 независимых разведений стандартного образца. Предел обнаружения метода составил 5 BAU/ml.

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения SPSS Statistics (IBM) и Microsoft Office Excel 2019. Для сравнения индекса авидности в группах пациентов использовали критерий Краскела–Уоллиса и U-критерий Манна–Уитни. Определение коэффициента корреляции проводили с использованием критерия Спирмена.

Результаты и обсуждение

Образцы. Исследование было проведено на двух выборках образцов, полученных в разные временные промежутки от начала пандемии COVID-19.

В исследование были включены 87 образцов сывороток крови от реконвалесцентов COVID-19, переболевших в период с марта по сентябрь 2020 г. (группа № 1). Для добровольцев данной выборки была известна дата заболевания (за таковую принимали дату наступления первых симптомов или первого положительного ПЦР-теста на РНК SARS-CoV-2), и, следовательно, время, прошедшее от момента иммунизации до момента взятия образца.

Также было исследовано 204 образца, полученных в сентябре 2021 г. от сотрудников специализированного многопрофильного психиатрического стационара ГБУЗ МО «Психиатрическая больница им. В.И. Яковенко». Данная выборка была представлена двумя группами: группой пациентов, прошедших вакцинацию Гам-Ковид-Вак (группа № 2), и пациентов, имеющих гибридный иммунитет, то есть перенесших болезнь COVID-19 и двукратно вакцинированных Гам-Ковид-Вак (группа № 3). Для всех добровольцев групп № 2 и № 3 были известны даты вакцинации и характер иммунитета (поствакцинальный или гибридный).

Количество антител в зависимости от типа иммунизации. На первом этапе исследования для исследуемых групп было определено количественное содержание IgG к RBD, выраженное в международных единицах BAU/ml (табл. 1). Показано, что медианное значение количества

Таблица 1. Результаты сравнения количественного определения IgG к RBD SARS-CoV-2 в группах пациентов, различающихся по способу иммунизации

Table 1. Comparison of quantitatively assessed IgG against SARS-CoV-2 RBD in patient groups with varying method of immunization

Иммунный статус Immune status	IgG, BAU/ml		p-value
	Me [Q1–Q3]	Min–max	
Только переболевшие COVID-19 (n = 87) COVID-19 convalescents (n = 87)	75 [46–118]	15–183	$p < 0{,}001^*$ $p_{1-2} < 0{,}571$ $p_{1-3} < 0{,}001^*$ $p_{2-3} < 0{,}001^*$
Только вакцинированные (n = 64) Vaccinated (n = 64)	119 [36–304]	7–2356	
«Гибридный» иммунитет (n = 140) Hybrid immunity (n = 140)	228 [107–619]	10–7344	

Примечание. *Различия показателей статистически значимы ($p < 0{,}05$).
Notes. *Significant differences ($p < 0.05$).

антител в группе добровольцев с «гибридным» иммунитетом (228 BAU/ml) достоверно выше такового значения как в группе переболевших (75 BAU/ml), так и в группе вакцинированных (119 BAU/ml, $p < 0{,}001$ в обоих случаях), при этом группы только переболевших или вакцинированных по данному параметру между собой не различались (табл. 1). Это закономерный результат, говорящий о том, что многократная иммунизация, в общем случае, приводит к формированию более напряженного иммунитета по сравнению с однократно перенесенным заболеванием или одним курсом вакцинации.

Авидность антител в зависимости от типа иммунизации. В исследуемых группах также определяли показатель ИА% с использованием относительно слабого денатурирующего агента (4М мочевины). Полученные результаты (табл. 2, рис. 1) свидетельствуют о том, что «гибридная» иммунизация приводит, в среднем, к формированию достоверно более высокоавидных антител (медианное значение индекса

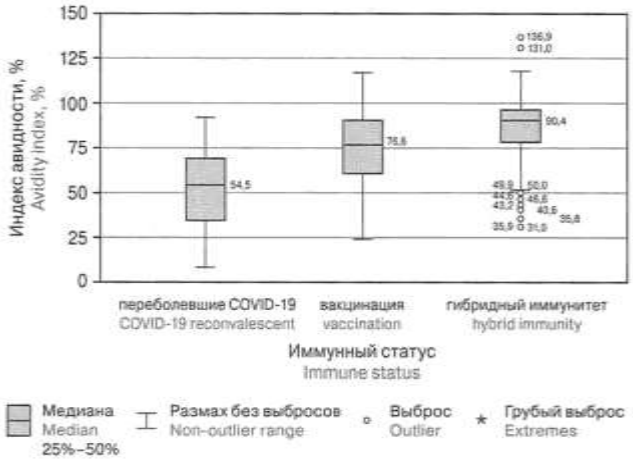


Рисунок 1. Диаграмма зависимости индекса авидности (4М мочевина) от способа иммунизации пациентов

Figure 1. Avidity index (4M urea)/immunization method relation

авидности в группе 90,5%) не только по сравнению с однократно перенесенным заболеванием (ИА 54,5%, $p < 0{,}001$), но и одним курсом вакцинации (ИА 76,6%, $p < 0{,}001$, табл. 2). При этом важным результатом явилось то, что в исследуемых группах вакцинация приводила к формированию более высокоавидных антител, чем перенесенное заболевание (ИА 76,6% в группе реконвалесцентов против 54,5% у вакцинированных, $p < 0{,}001$, табл. 2).

Для разграничения низко- и высокоавидных антител, образовавшихся после инфекций, дающих длительный протективный иммунитет (IgG-антитела к вирусам кори, краснухи и другим хорошо изученным возбудителям [6, 7, 10, 17]), обычно используется 7–8 М мочевина.

Для установления степени матурации авидности антител IgG к RBD SARS-CoV-2 образцы были также исследованы с использованием 8М мочевины. Результаты данного эксперимента представлены в табл. 3 и на рис. 2.

При использовании 8М мочевины различия в ИА IgG-антител к RBD между группами только вакцинированных (14,8%) или однократно переболевших (16%) становятся незначимыми (табл. 3, рис. 2). В то же время медианный ИА, полученный с использованием 8М мочевины в группе добровольцев с «гибридной» иммунизацией (25%), по-прежнему был достоверно более высоким по сравнению с обеими группами с однократной иммунизацией ($p < 0{,}001$ в обоих случаях, табл. 3). Это подтверждает заключение о том, что вакцинация и перенесенное заболевание COVID-19 приводят к формированию более эффективного иммунитета, выражающегося не только в большем количестве IgG (см. раздел, посвященный количественному определению антител), но и в их более высокой авидности.

Однако даже в группе с гибридным иммунитетом уровень матурации антител к RBD SARS-CoV-2 оставался неполным. При использовании 8М мочевины количество образцов

Таблица 2. Результаты сравнения индекса авидности IgG к RBD SARS-CoV-2 в группах пациентов, различающихся по способу иммунизации (4М мочевина, см. пояснения в тексте)

Table 2. Comparison of IgG avidity index to SARS-CoV-2 RBD in patient groups varying in the method of immunization (4M urea, see explanations in the text)

Иммунный статус Immune status	Индекс авидности, % Avidity index, %		p-value
	Me [Q1-Q3]	Min; max	
Только переболевшие COVID-19 (n = 87) COVID-19 convalescent subjects (n = 87)	54,5 [34,6–69,0]	8,0; 92,0	$p < 0,001^*$ $p_{1-2} < 0,001^*$ $p_{1-3} < 0,001^*$ $p_{2-3} < 0,001^*$
Только вакцинированные (n = 64) Vaccinated subjects (n = 64)	76,6 [60,9–90,5]	23,9; 52,5	
«Гибридный» иммунитет (n = 140) Hybrid immunity (n = 140)	90,5 [78,4–96,3]	31,0; 100	

Примечание. *Различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).
Note. *Significant differences ($p < 0.05$).

Таблица 3. Результаты сравнения индекса авидности IgG к RBD SARS-CoV-2 в группах пациентов, различающихся по способу иммунизации (8М мочевина)

Table 3. Comparison of IgG avidity index to SARS-CoV-2 RBD in patient groups differed in immunization method (8M urea)

Иммунный статус Immune status	Индекс авидности, % Avidity index, %		p-value
	Me [Q1–Q3]	Min; max	
Только переболевшие COVID-19 (n = 87) COVID-19 convalescent subjects (n = 87)	14,8 [10,3–18,7]	5,8; 37,6	$p < 0,001^*$ $p_{1-2} < 0,233$ $p_{1-3} < 0,001^*$ $p_{2-3} < 0,001^*$
Только вакцинированные (n = 64) Vaccinated subjects (n = 64)	16,0 [10,0–28,4]	2,8; 52,5	
«Гибридный» иммунитет (n = 140) Hybrid immunity (n = 140)	25,0 [17,6–36,0]	1,2; 91,5	

Примечание. *Различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).
Note. *The differences are significant ($p < 0.05$).

с ИА ≥ 50 составило только 5,7% (8/140). Это косвенно подтверждает ранее высказанное другими авторами [2, 19] мнение о том, что в случае SARS-CoV-2 IgG-антитела значительно реже проходят полный цикл матурации по сравнению с антителами, продуцируемыми рядом других возбудителей.

Исследование динамики матурации авидности. Поскольку в настоящее исследование была включена группа реконвалесцентов (первая выборка) с известными сроками иммунизации (отсчитываемыми от даты появления первых симптомов или первого положительного ПЦР-теста), был исследован вопрос об изменении ИА с течением времени. Для этого в 87 образцах первой выборки было проведено определение ИА с использованием 4М мочевины в качестве денатурирующего агента. При этом у 22 пациентов анализировались образцы с повторным взятием крови (2–4 раза с интервалом примерно 2 месяца). Результаты зависимости ИА от срока иммунизации представлены на рис. 3 и 4 и демонстрируют четкую тенденцию к увеличению авидности со временем: применение критерия Спирмена показало, что корреляционная связь является сильной и статистически значимой ($r_s = 0,777$, $p < 0,001$).

По результатам исследования 40 образцов содержали антитела с ИА < 50%, 47 образцов — с ИА ≥ 50%. При этом 3 образца (3,4%) имели антитела с ИА ≥ 50% на сроке иммунизации до 3 месяцев (тяжелое течение инфекции); 9 образцов от 3-х пациентов имели антитела с ИА < 50% по-

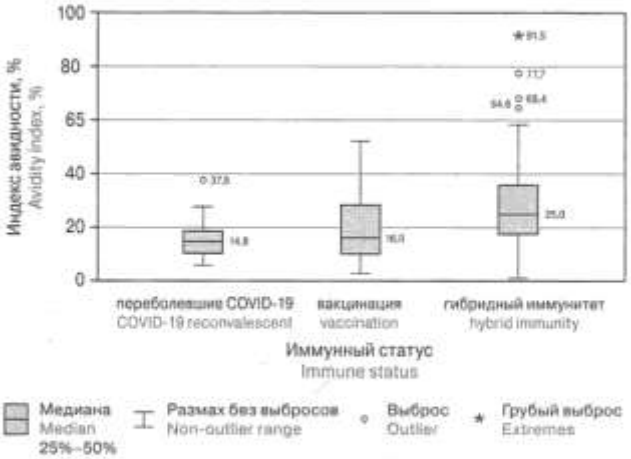


Рисунок 2. Диаграмма зависимости индекса авидности (8М мочевина) от способа иммунизации пациентов

Figure 2. Avidity index (8M urea)/immunization method relation

Рисунок 3. Корреляция между индексом авидности (%, 4М мочевина) IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 и сроком, прошедшим от иммунизации до взятия образца (n = 87)

Figure 3. Correlation between the avidity index (%, 4M urea) of IgG antibodies to SARS-CoV-2 RBD and post-immunization timeframe (n = 87)

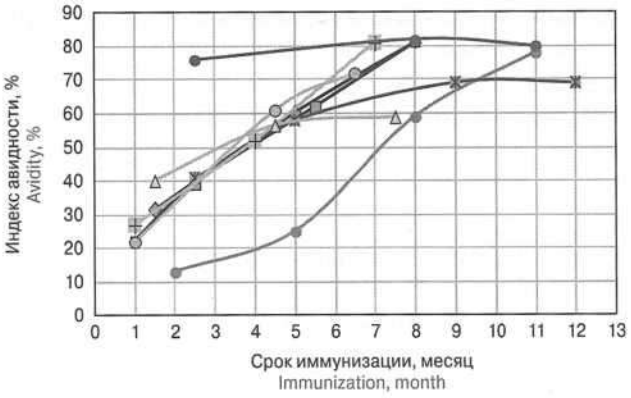


Рисунок 4. Зависимость индекса авидности (4М мочевина) IgG-антител к RBD SARS-CoV-2 от срока иммунизации на примере 10 пациентов (минимум три взятия крови)

Figure 4. SARS-CoV-2 RBD IgG antibody avidity index (4M urea)/immunization timeframe (10 patients, at least three blood samples collected)

сле 3 месяцев с момента иммунизации; в 9 образцах сывороток крови были обнаружены антитела с индексом авидности ниже 50% через 3 месяца с момента иммунизации. Из них у одного пациента антитела с ИА ≥ 50% образовались через 5 месяцев, у двоих — через 8 месяцев. За все время исследования у 3 пациентов наблюдались антитела с индексом авидности менее 50%.

Сравнение степени матурации антител к SARS-CoV-2 в зависимости от кратности иммунизации и способа иммунизации. Для выяснения зависимости авидности антител от кратности иммунизации был проведен анализ результатов определения индекса авидности (4М мочевина) у пациентов однократно переболевших COVID-19 в 2020 г. и двукратно иммунизированных Гам-Ковид-Вак. Для этого были отобраны образцы пациентов первой выборки (переболевшие COVID-19), полученные в срок до 4 месяцев с момента заболевания [11], и образцы второй выборки с поствакцинальным иммунитетом на сроке введения второго компонента вакцины Гам-Ковид-Вак не более 3 месяцев до момента взятия крови.

Из данных, представленных в табл. 4, видно, что полный курс вакцинации приводит к образованию достоверно более высокоавидных антител, чем перенесенное заболевание даже на ранних сроках иммунизации — до 4 месяцев. Действительно, в группе вакцинированных медианный ИА составил 82%, а в группе переболевших того же срока — всего 36%, что заставляет предположить, что вакцинация двумя дозами вызывает более быструю матурацию и, следовательно, такой способ иммунизации скорее формирует гуморальный иммунитет более высокой протективности.

Таким образом, проведенное исследование динамики матурации авидности антител класса G к RBD SARS-CoV-2 в зависимости от способа и кратности иммунизации показало, что наиболее эффективный иммунитет формируется у пациентов с гибридным иммунитетом, то есть переболевших и вакцинированных полным курсом препарата Гам-Ковид-Вак. Однако следует отметить, что даже в группе с гибридным иммунитетом уровень матурации антител к RBD SARS-CoV-2 оставался неполным.

Таблица 4. Результаты сравнения индекса авидности (4М мочевина) в группах пациентов, перенесших COVID-19 или вакцинированных в срок не более 4 месяцев до проведения исследования

Table 4. Comparison of the avidity index (4M urea) in groups of COVID-19 convalescent subjects or vaccinated individuals up to 4 months before the study

Иммунный статус Immune status	**Индекс авидности, %** Avidyty index, %		**p-value**
	Me [Q1–Q3]	**Min; max**	
Переболевшие COVID-19 (n = 44) COVID-19 convalescent subjects (n = 44)	36,0 [25,5–50,7]	8,0; 78,0	p < 0,001
Вакцинация (n = 57) Vaccinated subjects (n = 57)	81,9 [60,9–92,1]	24,0; 100	

Если же говорить о сравнении таких способов иммунизации, как перенесенный однократно COVID-19 или вакцинация полным курсом Гам-Ковид-Вак, то вакцинация является предпочтительной. Она приводит к более высоким уровням IgG (медианные значения в группах 119 и 75 BAU/ml, $p < 0,001$) и к более высокому индексу их авидности (76,6% против 54,5%). Однако следует отметить, что результаты, анализируемые в данной работе, получены на образцах, взятых, в основном, на сроке вакцинации до 5 месяцев, и динамика изменения уровня антител детально не изучалась.

Полученные данные расширяют наши знания о процессах формирования гуморального иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2, проливают новый свет на скорость матурации IgG, вырабатываемых к данному опасному возбудителю, и могут быть использованы специалистами практического здравоохранения при оценке иммунного статуса пациентов и принятии решения о ревакцинации против инфекции COVID-19.

Список литературы/References

1. Abdullahi Nasir I., Babayo A., Shehu M.S. Clinical significance of IgG avidity testing and other considerations in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: a review update. *Med. Sci. (Basel), 2016, vol. 4, no. 1: 5. doi: 10.3390/medsci4010005*
2. Bauer G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2. *Int. J. Infect. Dis., 2021, no. 106, pp. 61–64. doi: 10.1016/j.ijid.2021.01.061*
3. Benner S.E., Patel E.U., Laeyendecker O., Pekosz A., Littlefield K., Eby Y., Fernandez R.E., Miller J., Kirby C.S., Keruly M., Klock E., Baker O.R., Schmidt H.A., Shrestha R., Burgess I., Bonny T.S., Clarke W., Caturegli P., Sullivan D., Shoham S., Quinn T.C., Bloch E.M., Casadevall A., Tobian A.A.R., Redd A.D. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J. Infect. Dis., vol. 222, no. 12, pp. 1974–1984. doi: 10.1093/infdis/jiaa581*
4. Chan K.H., Sonnenberg K., Niedrig M., Lam S.Y., Pang C.M., Chan K.M., Ma S.K., Seto W.H., Peiris J.S. Use of antibody avidity assays for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin. Vaccine Immunol., 2007, vol. 14, no. 11, pp. 1433–1436. doi: 10.1128/CVI.00056-07*
5. Chan P.K., Lim P.L., Liu E.Y., Cheung J.L., Leung D.T., Sung J.J. Antibody avidity maturation during severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *J. Infect. Dis., 2005, vol. 192, no. 1, pp. 166–169. doi: 10.1086/430615*
6. Delgado M.F., Coviello S., Monsalvo A.C., Melendi G.A., Hernandez J.Z., Batalle J.P., Diaz L., Trento A., Chang H.Y., Mitzner W., Ravetch J., Melero J.A., Irusta P.M., Polack F.P. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat. Med., 2009, vol. 15, no. 1, pp. 34–41. doi: 10.1099/jgv.0.001439*
7. Ding Y.X., Mao N.Y., Zhang Y., Lei Y., Gao Z.G., Xu W.B., Zhang Y. Measles virus IgG avidity assay for use in identification of measles vaccine failures in Tianjin, China. *Biomed. Environ. Sci., 2019, vol., 32, no. 11, pp. 804–811. doi: 10.3967/bes2019.102*
8. Dörner T., Radbruch A. Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity, 2007, vol. 27, no. 3, pp. 384–392. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.002*
9. Hedman K., Seppälä I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Clin. Immunol., 1988, vol. 8, no. 3, pp. 214–221. doi: 10.1007/BF00917569*
10. Kaneko M., Ohhashi M., Minematsu T., Muraoka J., Kusumoto K., Sameshima H. Maternal immunoglobulin G avidity as a diagnostic tool to identify pregnant women at risk of congenital cytomegalovirus infection. *J. Infect. Chemother., 2017, vol. 2, no. 3, pp. 173–176. doi: 10.1016/j.jiac.2016.12.001*
11. Klein S.L., Pekosz A., Park H.S., Ursin R.L., Shapiro J.R., Benner S.E., Littlefield K., Kumar S., Naik H.M., Betenbaugh M.J., Shrestha R., Wu A.A., Hughes R.M., Burgess I., Caturegli P., Laeyendecker O., Quinn T.C., Sullivan D., Shoham S., Redd A.D., Bloch E.M., Casadevall A., Tobian A.A. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J. Clin. Invest., 2020, vol. 130, no. 11, pp. 6141–6150. doi: 10.1172/JCI142004*
12. Leruez-Ville M., Ville Y. Is it time for routine prenatal serological screening for congenital cytomegalovirus? *Prenat. Diagn., 2020, vol. 40, no. 13, pp. 1671–1680. doi: 10.1002/pd.5757*
13. Liu T., Hsiung J., Zha S., Kost J., Sreedhar D., Hanson C.V., Olson K., Keare D., Chang S.T., Bliden K.P., Gurbel P.A., Tantry U.S., Roche J., Press C., Boggs J., Rodriguez-Soto J.P., Montoya J.G., Tang M., Dai H. Quantification of antibody avidities and accurate detection of SARS-CoV-2 antibodies in serum and saliva on plasmonic substrates. *Nat. Biomed. Eng., 2020, vol. 4, no. 12, pp. 1188–1196. doi: 10.1038/s41551-020-00642-4*
14. Luo Y.R., Chakraborty I., Yun C., Wu A. H B, Lynch K.L. Kinetics of SARS-CoV-2 antibody avidity maturation and association with disease severity. *Clin. Infect. Dis., 2020, vol. 73, no. 9, pp. e3095–e3097. doi: 10.1093/cid/ciaa1389*
15. Manuylov V., Burgasova O., Borisova O., Smetanina S., Vasina D., Grigoriev I., Kudryashova A., Semashko M., Cherepovich B., Kharchenko O., Kleymenov D., Mazunina E., Tkachuk A., Gushchin V. Avidity of IgG to SARS-CoV-2 RBD as a prognostic factor for the severity of COVID-19 reinfection. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 3: 617. doi: 10.3390/v14030617*
16. Mattiuzzo G., Bentley E.M., Hassall M., Routley S., Richardson S., Bernasconi V., Kristiansen P., Harvala H., David Roberts D., Semple M.G., Turtle L.C.W., Openshaw P.J.M., Baillie K., Nissen-Meyer L.S.H., Brantsæter A.B., Baxendale H., Atkinson E., Rigsby P., Padley D., Almond N., Rose N.J. Establishment of the WHO International standard and reference panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. *Expert Committee on Biological Standartization, Geneva, 9–10 December 2020. doi: WHO/BS/2020.2403E*
17. Puschnik A., Lau L., Cromwell E.A., Balmaseda A., Zompi S., Harris E. Correlation between Dengue-specific neutralizing antibodies and serum avidity in primary and secondary Dengue virus 3 natural infections in humans. *PLoS Negl Trop. Dis., 2013, vol. 7, no. 6: e2274. doi: 10.1371/journal.pntd.0002274*
18. Revello M.G., Zavattoni M., Furione M., Lilleri D., Gorini G., Gerna G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J. Infect. Dis., 2002, vol. 186, no. 4, pp. 553–557. doi: 10.1086/341831*

19. Struck F., Schreiner P., Staschik E., Wochinz-Richter K., Schulz S., Soutschek E., Motz M., Bauer G. Vaccination versus infection with SARS-CoV-2: establishment of a high avidity IgG response versus incomplete avidity maturation. *J. Med. Virol., 2021, vol. 93, no. 12, pp. 6765–6777. doi: 10.1002/jmv.27270*
20. Struck F., Schreiner P., Staschik E., Wochinz-Richter K., Schulz S., Soutschek E., Motz M., Bauer G. Incomplete IgG avidity maturation after seasonal coronavirus infections. *J. Med. Virol., 2021, vol. 94, no. 1, pp. 186–196. doi: 10.1002/jmv.27291*
21. Vauloup-Fellous C., Grangeot-Keros L. Humoral immune response after primary rubella virus infection and after vaccination. *Clin. Vaccine Immunol., 2007, vol. 14, no. 5, pp. 5644–5647. doi: 10.1128/CVI.00032-07*
22. Wratil P.R., Stern M., Priller A., Willmann A., Almanzar G., Vogel E., Feuerherd M., Cheng C.C., Yazici S., Christa C., Jeske S., Lupoli G., Vogt T., Albanese M., Mejías-Pérez E., Bauernfried S., Graf N., Mijocevic H., Vu M., Tinnefeld K., Wettengel J., Hoffmann D., Muenchhoff M., Daechert C., Mairhofer H., Krebs S., Fingerle V., Graf A., Steininger P., Blum H., Hornung V., Liebl B., Überla K., Prelog M., Knolle P., Keppler O.T., Protzer U. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat. Med., 2022, vol. 28, no. 3, pp. 496–503. doi: 10.1038/s41591-022-01715-4*

Авторы:

Кудряшова А.М., научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Мануйлов В.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансляционной биомедицины ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;
Мурзина А.А., младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Каира А.Н., д.м.н., зав. лабораторией эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Борисова О.В., к.х.н., зав. лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Kudryashova A.M., Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Manuylov V.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Translational Biomedicine, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Murzina A.A., Junior Researcher, Laboratory of the Epidemiological Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kaira A.N., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Epidemiologic Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head of the Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.10.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 19.10.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 75–90

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 75–90

SARS-CoV-2 COLLECTIVE IMMUNITY AMONG THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF ARMENIA

A.Yu. Popova[a], V.S. Smirnov[b], S.A. Egorova[b], A.V. Vanyan[c], A.M. Milichkina[b], N.G. Bakunts[c], I.V. Drozd[b], R.A. Abovyan[c], V.A. Ivanov[b], G.G. Melik-Andreasyan[c], E.S. Ramsay[b], G.H. Palozyan[c], T.V. Arbuzova[b], A.S. Keshishyan[c], O.B. Zhimbayeva[b], O.A. Petrova[b], A.V. Gubanova[b], A.P. Razumovskaya[b], A.A. Totolian[b]

[a] *Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[c] *National Center for Disease Control and Prevention, Yerevan, Armenia*

Abstract. *Background.* The COVID-19 pandemic has become a substantial global health crisis, unparalleled in world history. Infection dynamics can have specific characteristics in different countries due to social, economic, climatic, or geographic factors. Aim: to study features of SARS-CoV-2 collective immunity among the Armenian population. *Materials and methods.* A cross-sectional, randomized study of collective immunity was carried out according to a program developed by Rospotrebnadzor and the St. Petersburg Pasteur Institute, taking into account WHO recommendations. The study was approved by the ethics committees of the National Center for Infectious Diseases (Armenia) and the St. Petersburg Pasteur Institute (Russia). A volunteer cohort was formed (N = 6057), randomized by age and region. The study's analysis included: shares and distributions of antibodies (Abs) to nucleocapsid (Nc) antigen (Ag) and receptor binding domain (RBD) S-1 Ag in the cohort; and quantitative determination of these Abs by ELISA. During the survey, a history of vaccination was indicated by 4395 people. *Results.* Overall seropositivity formed in the whole cohort (by April 14, 2022) was 98.6% (95% CI: 98.1–98.7). It did not depend on age, place of residence, or occupation. When quantifying Nc and RBD Abs, the proportions of volunteers with Nc Ab levels of 1–17 BAU/ml and RBD Ab levels of 22.6–220 BAU/ml were the smallest, amounting to 6.9% (95% CI: 6.2–7.5) and 20.4% (95% CI: 19.4–21.4), respectively. With increasing serum concentrations (Nc > 667 BAU/ml, RBD > 450 BAU/ml), the proportions of individuals with the corresponding levels were 20.2% for Nc (95% CI: 19.2–21.3) and 54.2% for RBD (95% CI: 52.9–55.5). Vaccination coverage was 72.6% (95% CI: 71.5–73.7). The most frequently used were Sinopharm/BIBP (32.4%), AZD1222 (22.3%), and Gam-COVID-Vac (21%). The remaining vaccines (CoronaVac, mRNA-1273, BNT162b2, CoviVac) were used by 24.3% of vaccinated individuals. When summing vaccines by platform, it was found that: vector vaccines were used in 40.34% (95% CI: 33.57–42.39) of cases; whole-virion vaccines were used in 26.83% (95% CI: 24.76–32.20); and vector vaccines were used in 6.33% (95% CI: 4.84–8.91). *Conclusion.* The epidemic situation in Armenia by April 2022 was characterized by a high level of collective immunity, independent of age or regional factors. Vector and whole-virion vaccines have been used most widely.

Key words: *SARS-CoV-2, COVID-19, Republic of Armenia, volunteers, herd immunity, population, vaccination.*

Адрес для переписки:
Смирнов Вячеслав Сергеевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (911) 948-59-22 (моб.).
E-mail: vssmi@mail.ru

Contacts:
Vyacheslav S. Smirnov
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (911) 948-59-22 (mobile).
E-mail: vssmi@mail.ru

Для цитирования:
Попова А.Ю., Смирнов В.С., Егорова С.А., Ванян А.В., Миличкина А.М., Бакунц Н.Г., Дрозд И.В., Абовян Р.А., Иванов В.А., Мелик-Андреасян Г.Г., Рэмзи Э.С., Палозян Г.О., Арбузова Т.В., Кешишян А.С., Жимбаева О.Б., Петрова О.А., Губанова А.В., Разумовская А.П., Тотолян А.А. Коллективный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Республики Армения // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 75–90. doi: 10.15789/2220-7619-SCI-2450

Citation:
Popova A.Yu., Smirnov V.S., Egorova S.A., Vanyan A.V., Milichkina A.M., Bakunts N.G., Drozd I.V., Abovyan R.A., Ivanov V.A., Melik-Andreasyan G.G., Ramsay E.S., Palozyan G.H., Arbuzova T.V., Keshishyan A.S., Zhimbayeva O.B., Petrova O.A., Gubanova A.V., Razumovskaya A.P., Totolian A.A. SARS-CoV-2 collective immunity among the population of the Republic of Armenia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 75–90. doi: 10.15789/2220-7619-SCI-2450

© Popova A.Yu. et al., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SCI-2450

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

КОЛЛЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ К SARS-CoV-2 НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ

А.Ю. Попова[1], В.С. Смирнов[2], С.А. Егорова[2], А.В. Ванян[3], А.М. Миличкина[2], Н.Г. Бакунц[3], И.В. Дрозд[2], Р.А. Абовян[3], В.А. Иванов[2], Г.Г. Мелик-Андреасян[3], Э.С. Рэмзи[2], Г.О. Палозян[3], Т.В. Арбузова[2], А.С. Кешишян[3], О.Б. Жимбаева[2], О.А. Петрова[2], А.В. Губанова[2], А.П. Разумовская[2], А.А. Тотолян[2]

[1] Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия
[2] ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[3] ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний, Ереван, Армения

Резюме. *Введение.* Пандемия COVID-19 стала серьезным глобальным кризисом в области здравоохранения, не имеющим аналогов в мировой истории. Динамика инфекции может иметь специфические особенности в разных странах в силу социальных, экономических, климатических или географических факторов. Цель: изучить особенности коллективного иммунитета против SARS-CoV-2 среди населения Армении. *Материалы и методы.* Поперечное рандомизированное исследование коллективного иммунитета проводили по программе, разработанной Роспотребнадзором и Санкт-Петербургским институтом Пастера с учетом рекомендаций ВОЗ. Исследование одобрено этическими комитетами Национального центра инфекционных болезней (Армения) и Санкт-Петербургского института Пастера (Россия). Была сформирована когорта добровольцев (N = 6057), рандомизированная по возрасту и региону. Анализ исследования включал: доли и распределение антител (АТ) к нуклеокапсиду (Nc), антигену (Ag) и рецепторсвязывающему домену (RBD) S-1 Ag в когорте; и количественное определение этих антител с помощью ELISA. В ходе опроса в анамнезе прививки указали 4395 человек. *Результаты.* Общая серопозитивность, сформированная во всей когорте (к 14 апреля 2022 г.), составила 98.6% (95% ДИ: 98.1–98.7). Оно не зависело от возраста, места жительства или рода занятий. При количественном определении антител Nc и RBD доля добровольцев с уровнями антител Nc 1–17 BAU/мл и уровнями антител RBD 22.6–220 BAU/мл была наименьшей и составила 6.9% (95% ДИ: 6.2–7.5). и 20.4% (95% ДИ: 19.4–21.4) соответственно. При повышении концентрации в сыворотке (Nc > 667 BAU/мл, RBD > 450 BAU/мл) доля лиц с соответствующими уровнями составляла 20.2% для Nc (95% ДИ: 19.2–21.3) и 54.2% для RBD (95% ДИ: 52.9–55.5). Охват вакцинацией составил 72.6% (95% ДИ: 71.5–73.7). Наиболее часто использовались Sinopharm/BIBP (32.4%), AZD1222 (22.3%) и Gam-COVID-Vac (21%). Остальные вакцины (CoronaVac, mRNA-1273, BNT162b2, CoviVac) использовали 24.3% привитых. При суммировании вакцин по платформам установлено, что: векторные вакцины применялись в 40.34% (95% ДИ: 33.57–42.39) случаев; цельновирионные вакцины использовались в 26.83% (95% ДИ: 24.76–32.20); и векторные вакцины использовались в 6.33% (95% ДИ: 4.84–8.91). *Вывод.* Эпидемическая ситуация в Армении к апрелю 2022 г. характеризовалась высоким уровнем коллективного иммунитета, не зависящим от возрастных и региональных факторов. Наибольшее распространение получили векторные и цельновирионные вакцины.

Ключевые слова: *SARS-CoV-2, COVID-19, Республика Армения, волонтеры, коллективный иммунитет, население, вакцинация.*

Introduction

The main feature of the COVID-19 pandemic has been the global spread of infection in an unprecedentedly short period of time in almost all countries of the world [19]. As those authors rightly point out, «The global crisis provoked by the coronavirus pandemic has no analogues in modern history.» As of 12/04/2022, 503 million cases have been registered globally (63 117 per 1 million pop.). Six million people died from COVID-19, or 1.23% of the total number of patients [3, 12]. Unfortunately, a universal COVID-19 treatment has not yet been created [21, 26]. Development of new drugs and re-purposing of existing ones frequently has been ineffective for various reasons [10]. In this context, the unprecedentedly rapid development and implementation of the SARS-CoV-2 vaccine family became the most important step in the fight against the COVID-19 pandemic [5].

The initial hopes placed on vaccination were largely justified. Israel can serve as an example. It was possible to reduce incidence by more than 150-fold as a result of mass immunization with the BNT162b2 (mRNA) vaccine from 24/01 to 3/04/2021 [7]. Unfortunately, mutational processes, alongside the emergence of new viral variants with potential to overcome existing adaptive immunity, significantly reduced the initial effect [24, 25]. COVID-19 prevalence in the Republic of Armenia (RA) was about 141 thousand cases per 1 million population as of April 2022. This is slightly higher than in neighboring Azerbaijan (75 thousand per million) and Iran (82 thousand per million), but significantly lower than in Georgia (444 thousand per million) and Turkey (170 thousand per million) [3, 6, 12]. Epidemic process dynamics in the RA were characterized by five waves (Fig. 1).

The first wave, the peak of which was recorded on June 22, 2020, was caused by the B4 strain (Fig. 1). The second wave, with a maximum on October 28, 2020, was the result of circulation of the B.1.1 virus. The third wave's emergence could be associated with the circulation of B.1.1.7 and the rise in morbidity

following the appearance of B.1.617.2. The fourth wave was caused mainly by the B.1.617.2 viral variant. Finally, the fifth wave was the result of the global spread of the B1.1.529 lineage [8, 11].

As in other countries, it was expected that specific vaccines against SARS-CoV-2 would become an important factor in controlling the pandemic. Scheduled vaccination began on 31/03/2021, when 565 people were first vaccinated with the 1st dose of vaccine. By June 20, 2021, 11 784 people had completed vaccination. Booster re-vaccination began on December 26, 2021 (Fig. 2).

The rate of vaccination subsequently slowed, and by 22/05/2022 the total number of vaccinated individuals in the RA was 1.1 million (38.1% of the total population). This value was, of course, insufficient to completely stop the pandemic [18]. However, another 422 900 people with adaptive immunity to SARS-CoV-2 following manifest COVID-19 illness should be added to the calculation [6, 12]. After a simple summation, we find that at least 51% of the population had real adaptive immunity as of April 22, 2022. Obviously, this number does not include individuals with asymptomatic infection. Therefore, the total percentage with immunity in the population may be much higher.

The purpose of the study was to analyze the level and structure of collective immunity among the Armenian population which had formed by the 16th month of the COVID-19 pandemic.

Materials and methods

The study was organized and conducted as part of scientific cooperation activities between countries of Eastern Europe, Transcaucasia, and Central Asia to assess population immunity to novel coronavirus infection in accordance with: Rospotrebnadzor order "Procedure for the Implementation of the Decree of the Government of the Russian Federation"

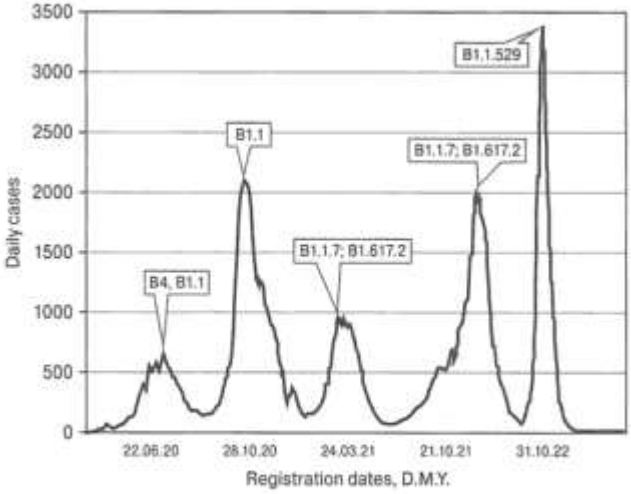


Figure 1. Incidence dynamics in the Armenian population for the entire observation period until April 14 2022

Note. The x-axis shows time with peak registrations (day.month.year) [17]. The y-axis shows the number of new cases registered daily. Frames show SARS-CoV-2 variants circulating during each wave.

(No. 1658-r, 18.06.2021) on the one hand; and order of the Ministry of Health (No. 380-A, 31.01.2022), Republic of Armenia, on the other.

Design and organization of the study

A cross-sectional, randomized cohort study of herd immunity was carried out according to a program developed by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare with the participation of the Saint Petersburg Pasteur Institute, taking into account WHO recommendations [15, 16]. A cloud service (internet server) was initially developed to facilitate formation of a representative sample of volunteers, organization of sampling, and quick analysis of results. Three days before study initiation, a wide explanatory campaign

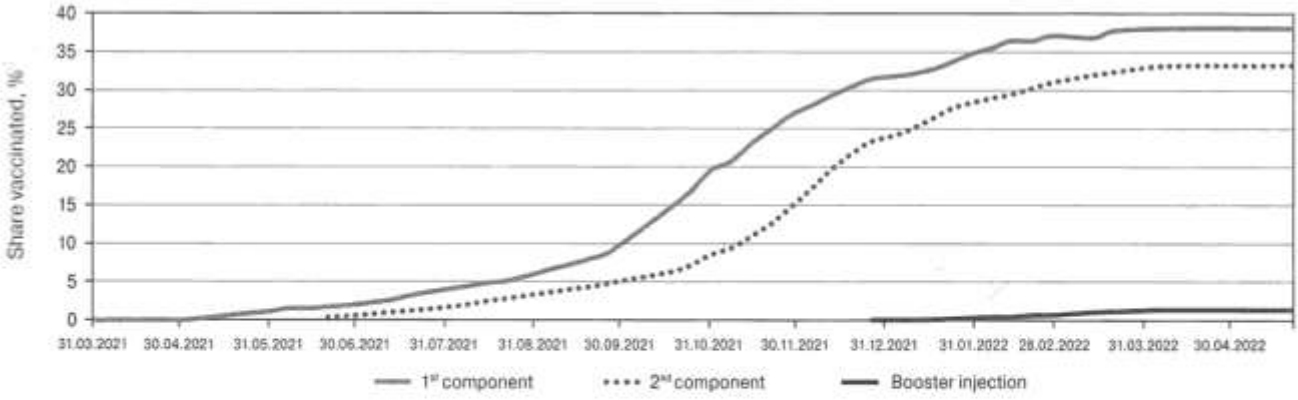


Figure 2. Dynamics of COVID-19 vaccination in Armenia [6]

Note. Seven-day moving averages are shown. 1st component — the proportion of residents who received the 1st vaccine component; 2nd component — the proportion who received the 2nd component (complete primary vaccination); booster — the proportion who received a booster dose of vaccine (re-vaccination). X-axis: date of registration (1 division = 1 month).

was conducted (TV, media, social networks) about the start of free testing for the presence of SARS-CoV-2 antibodies, including an internet link for completing a survey.

Those who expressed a desire to participate followed the link, filled out a questionnaire (Table 1S), and sent it to the cloud service. Received questionnaires were analyzed by the server for compliance with study inclusion criteria. If the candidate matched the requirements, he/she received a letter to their indicated e-mail address with a unique ID number and an invitation to follow an internet link for choosing a convenient blood sampling point and time. Grounds for non-inclusion in the study were: a refusal of subsequent laboratory testing; or the presence of manifest COVID-19 at the moment of questionnaire completion.

The cloud resource summarized the number of participants by age and place of residence. Registration of incoming questionnaires was terminated when the maximum number of volunteers in each age group living in each region was reached. In this case, the person received a rejection letter. This approach made it possible to effectively randomize a cohort of volunteers by age and region.

Each volunteer, or their legal representative (as with children), was acquainted with the goals and conditions of the upcoming study and signed an informed consent. The study was organized in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the National Center for Infectious Diseases of the Armenian Ministry of Health (No. 01, dated February 17, 2022) and the local Ethics Committee of the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 64, dated May 26, 2020). The algorithm of the study is shown in the flowchart below (Fig. 3). As shown, the survey is a continuous process from research design to final report preparation.

General characteristics of the volunteer cohort

The study was carried out in Yerevan and all Armenian regions. Blood samples were collected for five days from April 12–16, 2022. In accord-

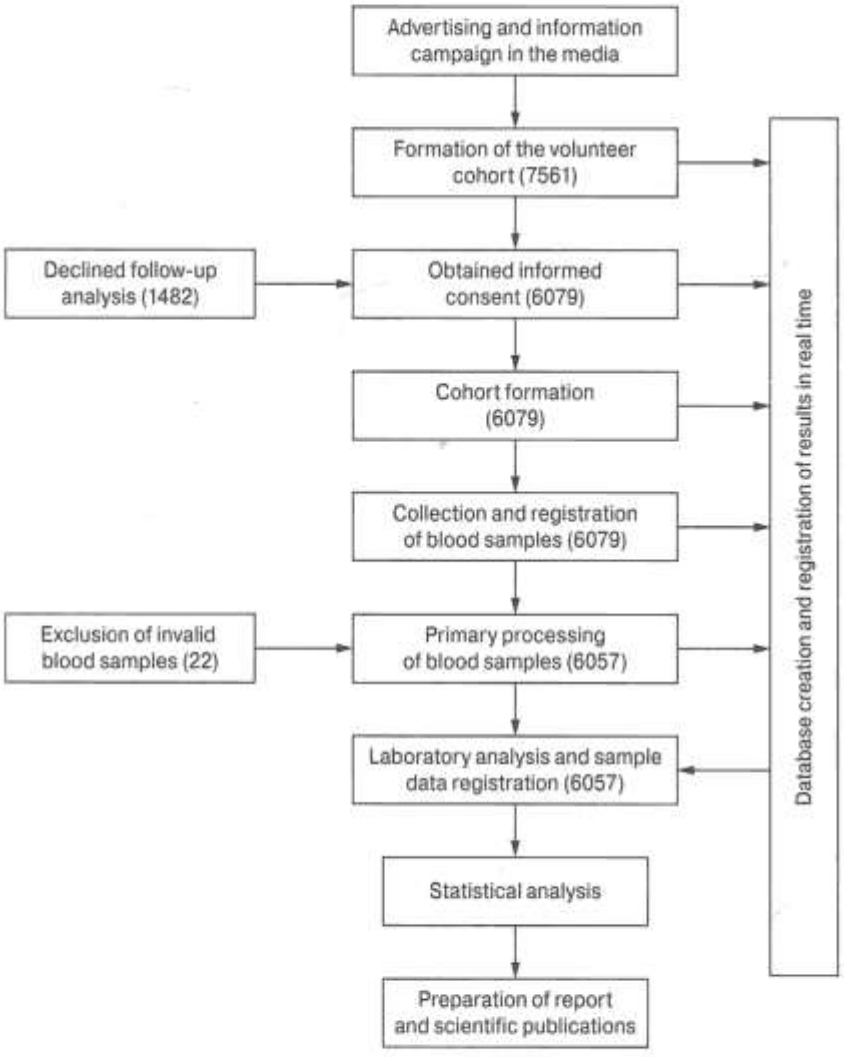


Figure 3. Algorithm for organization and conduct of the study of SARS-CoV-2 collective immunity in the Republic of Armenia

ance with the de Moivre–Laplace limit theorem [2], a cohort of 6079 volunteers was formed. After exclusion of invalid samples, 6057 people were included in the analyzed cohort. Volunteer distribution by age group turned out to be relatively homogeneous, both in terms of absolute value and share of representation (Table 1).

The number of volunteers who took part in the study represented 0.2% (95% CI: 0.20–0.21) of the country's population. Volunteers were distributed almost evenly across all regions (Table 2). As expected, the largest number of volunteers was recruited in Yerevan city (the capital). However, given the actual number of city residents, volunteer representation did not differ from that in other regions. Share representation (averaged) ranged from 0.18–0.22%, without significant differences in general for the RA. Regarding regional distribution, most volunteers lived in Yerevan city. The least were from Vayots Dzor Province, featuring the smallest population (Table 2).

As in other studies [13, 14], women participated more actively than men. The ratio (men, women) was 1399 (23.1%; 95% CI: 22.1–24.2) and 4655 (76.9%; 95% CI: 75.8–77.0), respectively. Among volunteers, 1750 people (28.9%; 95% CI: 27.8–30.1) had an official COVID-19 diagnosis (through a medical institution). The cohort included twelve occupational groups, the unemployed, pensioners, children (preschool, school age), and students (Table 2S). The most represented group was healthcare workers; their share in the surveyed cohort was 36.6% (95% CI: 35.4–37.8). The least volunteers (< 1.0%) were registered among transportation and agricultural workers, military personnel, and IT workers.

Table 1. Age structure of the volunteer cohort analyzed

Age group in years	Analyzed volunteers	
	Individuals	Percentage of entire cohort
1–17	670	11.07
1–6	71	1.19
7–13	225	3.73
14–17	374	6.19
18–29	702	11.60
30–39	962	15.89
40–49	954	15.78
50–59	973	16.11
60–69	972	16.06
70+	821	13.60
Total	6054	100

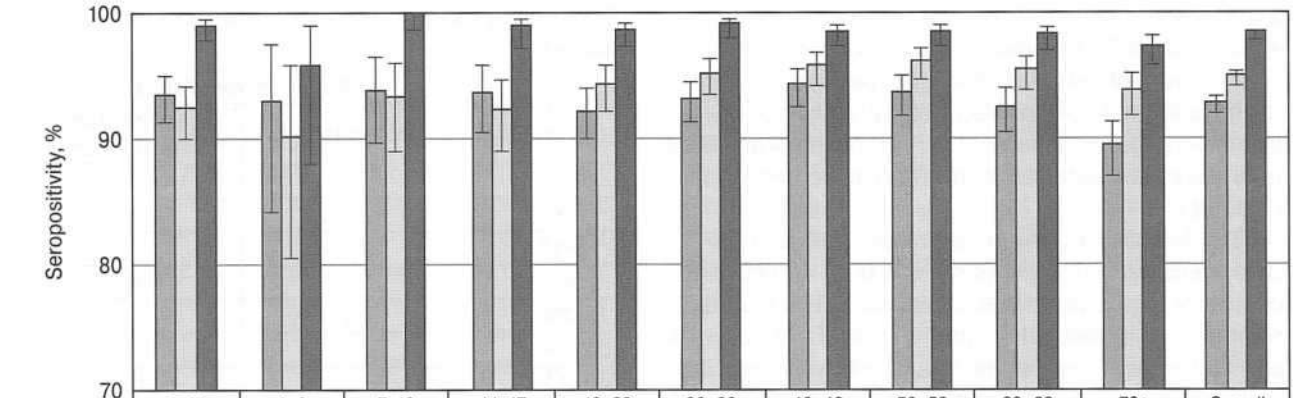
Organization of laboratory research

At the appointed time, the volunteer visited the blood collection point, where a medical officer took a blood sample from a peripheral vein (3 ml into vacutainers containing EDTA). After centrifugation, plasma was separated from cellular elements, transferred into plastic test tubes, and stored until analysis (≤ 24 hrs) at 4°C. COVID-19 recovery or SARS-CoV-2 vaccination results in the formation of various Abs. Antibodies to Nc and S protein receptor binding domain (RBD) feature prominently due to their high representation during infectious or post-vaccination processes. Thus, assessment of humoral immunity in the Armenian population included determination of Nc and RBD specific antibodies. The pooled proportion of volunteers who had any form of positive antibody status (Nc+, RBD+, Nc+RBD+) was termed complete seropositivity (CS). Antibody content (Nc, RBD) was quantified by ELISA using the appropriate test systems as described previously [16, 20]. Analytical results were expressed generally for groups (share seropositive) or quantitatively (BAU/ml). Received data, without any processing, was immediately transferred to the cloud service.

Table 2. Volunteer numbers and representation of different Armenian regions

District	Population			Examined, people		
	Urban	Rural	Total	Number	Share% (95% CI)	
					of overall number	of regional pop.
Yerevan city*	1 096 100	0	1 096 100	2407	39.7 (38.5–41.0)	0.22 (0.21–0.23)
Aragatsotn	26 400	97 800	124 200	218	3.6 (3.2–4.1)	0.18 (0.15–0.2)
Ararat	71 800	184 800	256 600	409	6.8 (6.1–7.4)	0.16 (0.14–0.18)
Armavir	82 500	181 700	264 200	527	8.7 (8.0–9.4)	0.20 (0.18–0.22)
Gegharkunik	66 000	161 000	227 000	491	8.1 (7.4–8.8)	0.22 (0.20–0.24)
Lori	124 800	87 100	211 900	458	7.6 (6.9–8.3)	0.22 (0.20–0.24)
Kotayk	136 700	114 700	251 400	542	9.0 (8.2–9.7)	0.22 (0.20–0.23)
Shirak	134 500	95 900	230 400	458	7.6 (6.9–8.3)	0.20 (0.18–0.22)
Tavush	50 100	69 800	119 900	229	3.8 (3.3–4.3)	0.19 (0.17–0.22)
Syunik	91 100	44 000	135 100	236	3.9 (3.4–4.4)	0.18 (0.15–0.20)
Vayots Dzor	16 700	31 100	47 800	82	1.4 (1.1–1.7)	0.17 (0.14–0.21)
Overall	1 896 700	1 067 900	2 964 600	6057	2.0 (2.0–2.1)	0.20 (0.20–0.21)

Note. *Yerevan city was considered like a district.



	1–17	1–6	7–13	14–17	18–29	30–39	40–49	50–59	60–69	70+	Overall
Nc Ab	93.5	93	93.8	93.6	92.2	93.1	94.3	93.7	92.5	89.4	92.8
RBD Ab	92.4	90.1	93.3	92.3	94.3	95.1	95.8	96.2	95.5	93.8	94.9
CS	99	95.8	100	98.9	98.6	99.1	98.5	98.5	98.3	97.3	98.4

Figure 4. Volunteer seroprevalence by age group
Note. Nc Ab — the share of volunteers with Nc Abs; RBD Ab — the share with RBD Abs; CS (complete seropositivity) — the share who have Abs to Nc or RBD (jointly or separately). Black vertical lines are confidence intervals. The x-axis shows age interval (years).

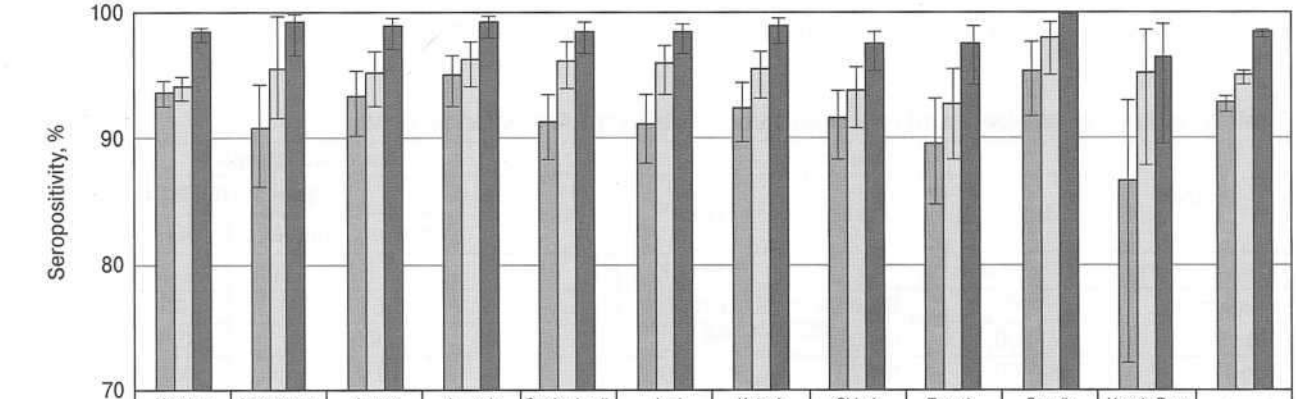
Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using functions in Microsoft Excel 2010. Mean values and confidence intervals of shares were calculated by the method of A. Wald and J. Wolfowitz [23] with the correction of A. Agresti and B.A. Coull [1]. The significance of differences in proportions was calculated by z-test using a special calculator [20]. For other statistical calculations not mentioned, Statistica 13 (StatSoft) was used. Unless otherwise indicated, $p \leq 0.05$ was used as the statistical threshold of significance for differences. Graphics were made in Microsoft Excel 2010 or Statistica 13.

Results

Volunteer seroprevalence by age group

Seropositivity in the volunteer cohort formed by the 16th month of the COVID-19 pandemic turned out to be quite high, significantly exceeding initial forecasts. Complete seropositivity (presence of either Ab, jointly or separately) for the cohort as a whole was 98.4% (95% CI: 98.1–98.7). Its level was approximately the same regardless of age interval (Fig. 4). Antibodies were absent in 94 volunteers (1.6%; 95% CI: 1.3–1.9). Nucleocapsid Ab seroprevalence (92.8%; 95% CI 92.1–93.4) was significantly lower



	Yerevan city	Aragatsotn region	Ararat region	Armavir region	Gegharkunik region	Lori region	Kotayk region	Shirak region	Tavush region	Syunik region	Vayots Dzor region	Overall
Nc Ab	93.6	90.8	93.2	94.9	91.2	91.1	92.4	91.5	89.5	95.3	86.6	92.8
RBD Ab	94.1	95.4	95.1	96.2	96.1	95.9	95.4	93.7	92.6	97.9	95.1	94.9
CS	98.3	99.1	98.8	99.2	98.4	98.3	98.9	97.4	97.4	100	96.3	98.4

Figure 5. Volunteer seroprevalence by region of residence
Note. Nc Ab — the share of volunteers with Nc Abs; RBD Ab — the share with RBD Abs; CS (complete seropositivity) — the share who have Abs to Nc or RBD (jointly or separately). Black vertical lines are confidence intervals. Armenian regions are shown on the x-axis. Yerevan city was considered like a district.

than RBD Ab seroprevalence (94.9%; 95% CI 94.3–95.4) in the cohort ($p < 0.01$).

When analyzing volunteers by age, there were no significant differences in CS. The share of volunteers with Nc Abs exceeded 90% in all age groups, but was significantly lower than the proportion of CS ($p < 0.01$) in all groups except for children aged 1–6 years old (Fig. 4). RBD seropositivity did not differ from Nc, but was again significantly lower than CS. Thus, the obtained data convincingly show that collective immunity exceeded 90% in all age groups. This would logically be expected to precede a sharp decrease in incidence, which was indeed confirmed by monitoring studies in April 2022 (Fig. 1).

In terms of gender, the cohort consisted of 23.1% males and 76.9% females. At serological examination, SARS-CoV-2 Ab status values in men were: 97.4% CS (95% CI: 96.5–98.2); 90.6% with Nc (95% CI: 89.0–92.1); and 91.9% with RBD Abs (90.4–93.2). Seropositivity in women was significantly higher than in men: 98.7% CS (95% CI: 98.4–99.0); 93.4% with Nc (95% CI: 92.7–94.1); and 95.8% with RBD Abs (95% CI: 95.2–96.3).

Volunteer seroprevalence by region of residence and professional activity

Considering the high level of collective immunity among volunteers in all age categories, it could be expected that the region of residence in Armenia (the smallest nation in the Transcaucasus, 29 743 km²) would not have a significant impact on seroprevalence. The results, with some reservation, confirm these assumptions. Thus, CS in general for the RA was 98.4% (95% CI: 98.1–98.7). The lowest seroprevalence was noted in Vayots Dzor Province (96.3%; 95% CI: 89.7–99.2). The highest was in Syunik Province (100%; 95% CI: 98.7–100). Seroprevalence

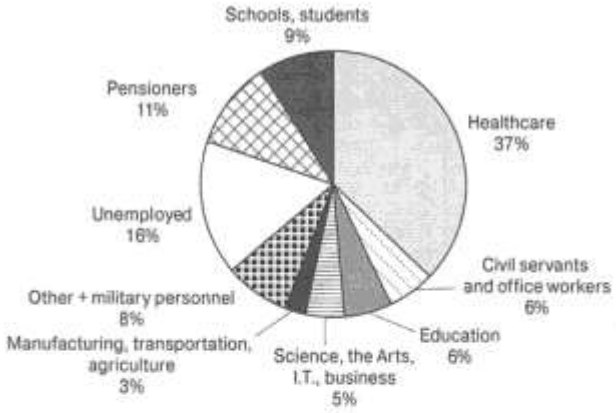
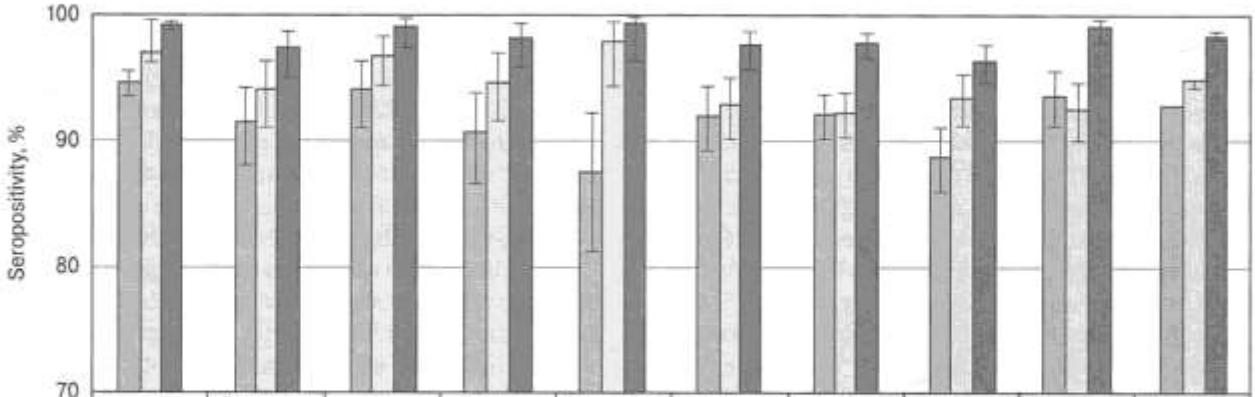


Figure 6. Distribution of the volunteer cohort by occupation with grouping
Note. Shares within frames are rounded to integer values.

distributions in other areas varied by 6–7%, without statistical significance at $p < 0.05$ (Fig. 5).

Occupation can be a significant factor determining SARS-CoV-2 infection risk and seroprevalence. The distribution of volunteers by occupation turned out to be very heterogeneous. The best represented groups were healthcare workers (36.6%; 95% CI: 35.4–37.8), unemployed (16.2%; 95% CI: 15.3–17.2), and pensioners (10.6%; 95% CI: 9.9–11.4%). Representative share for other fields ranged from 0.4–0.5% (agriculture, transportation, military, IT) to 5.7% (education). Since sample sizes in some professional categories turned out to be insufficiently representative, the data for a number of groups were combined, taking into account similar working conditions (Fig. 6).

Hence, the following combined groups were formed: 'civil servants and office workers'; 'workers in science, the Arts, IT-specialists, and business';



	Healthcare	Civil servants and office workers	Education	Science, the Arts, I.T., business	Manufacturing, transportation, agriculture	Other + military personnel	Unemployed	Pensioners	Schools, students	Overall
Nc Ab	94.7	91.6	94.2	90.8	87.6	92.1	92.2	88.8	93.7	92.8
RBD Ab	97.1	94.2	96.8	94.7	98	93	92.3	93.5	92.6	94.9
CS	99.3	97.4	99.1	98.2	99.4	97.7	97.9	96.4	99.1	98.4

Figure 7. Volunteer seroprevalence by field of activity
Note. Nc Ab — the share of volunteers with Nc Abs; RBD Ab — the share with RBD Abs; CS (complete seropositivity) — the share who have Abs to Nc or RBD (jointly or separately). Black vertical lines indicate confidence intervals.

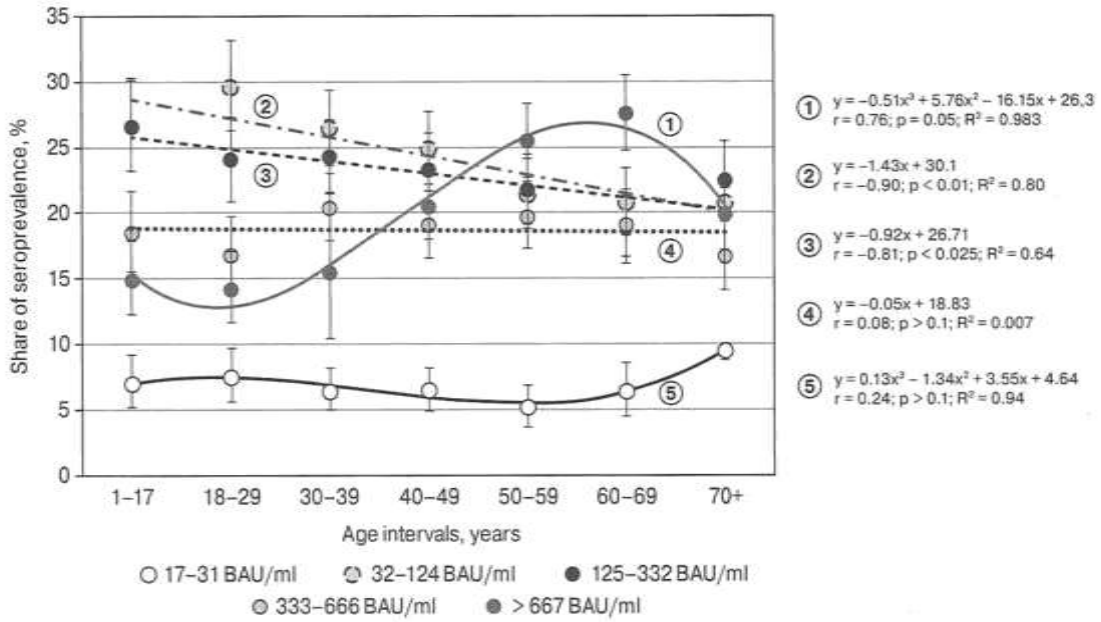


Figure 8. Nc antibody serological intervals plotted by age group

Note. Plasma Ab ranges are expressed in BAU/ml. Colored curves are trend lines for each Ab range. Regressions, rank correlation coefficients, p-values, and coefficients of determination are given (highlighted in the color of the corresponding range). Vertical black lines are 95% confidence intervals.

'workers in manufacturing, transportation, and agriculture'; and 'schoolchildren and students'. In the adjusted groups, the state of collective immunity was assessed by serological levels (Nc, RBD, CS) (Fig. 7).

Complete seropositivity among healthcare workers (99.3%; 95% CI: 98.9–99.6) was significantly higher, and among pensioners (96.4%; 95% CI: 94.7–97.7) significantly lower, than the cohort average ($p < 0.05$). Regarding Nc Ab status, the lowest seroprevalence values were observed in the groups 'manufacturing, agriculture, transportation' (87.6%; 95% CI: 81.3–92.4) and pensioners (88.8%; 95% CI: 86.1–91.1). The differences were significant ($p < 0.05$) relative to cohort Nc seropositivity (92.8%; 95% CI: 92.1–93.4). Unlike other professional groups, Nc seroprevalence in the group 'schoolchildren and students' (93.7%; 95% CI: 91.3–95.6) exceeded RBD seroprevalence (92.6%; 95% CI: 90.1–94.7), although insignificantly. This coincided with similar data seen in the children's group with age analysis (Fig. 3). When determining RBD seroprevalence levels, no significant differences were found between professional groups.

Thus, analysis of the structure of SARS-CoV-2 collective immunity among Armenian volunteers showed humoral responses in at least 90% regardless of age, place of residence, or occupation. However, this inevitably raises the question of the quantitative distribution of SARS-CoV-2 Abs.

Quantitative analysis of IgG antibodies to Nc and RBD by age

When assessing the quantitative content of Nc Abs, it was found that only a small proportion of seropositive volunteers had very low Ab levels, 17–31 BAU/ml, regardless of age (Fig. 8, Table 3S). The regression curve in this group was described by a 3rd degree polynomial of the form $y = 0.13x^3 - 0.34x^2 + 3.55x + 4.64$. A slightly higher proportion seropositive in the age group of 18–29 years, and slightly lower among those aged 50–59 years, was not significant.

The largest share of seropositive individuals had Nc Abs in the range 32–124 BAU/ml. The age distribution had a descending character described by a linear regression of the form $y = -1.43x + 30.1$ The equation correctly described the real distribution with a coefficient of determination $R = 0.80$. In other words, higher Nc Ab titers were accompanied by: an increase in the proportion of seropositive individuals aged 1–17 years, which amounted to 26.6% (95% CI: 23.3–30.1); and a decrease in the 70+ group to 20.8% (95% CI: 18.1–23.8). The differences were not statistically significant. However, the trend was statistically significant with a rank correlation coefficient of –0.90 at $p < 0.01$.

Higher Nc Ab levels in the range 125–332 BAU/ml did not change the form of the regression dependence, but led to a slight decrease in the equation's coefficient: $y = -0.92x + 26.1$. The regression line became flatter, the slope decreased to –1.0, and the coefficient of determination became 0.64. The rank correlation coefficient was –0.81 ($p < 0.025$).

In volunteers with Nc Ab levels in the range 333–666 BAU/ml, the shares of seropositivity were distributed almost evenly across all age groups. The regression was a horizontal line ($tg\alpha = -0.2$), described by the equation $y = -0.05x + 18.83$. Coefficients of rank correlation and determination varied within 0.08 and 0.007, respectively ($p > 0.1$).

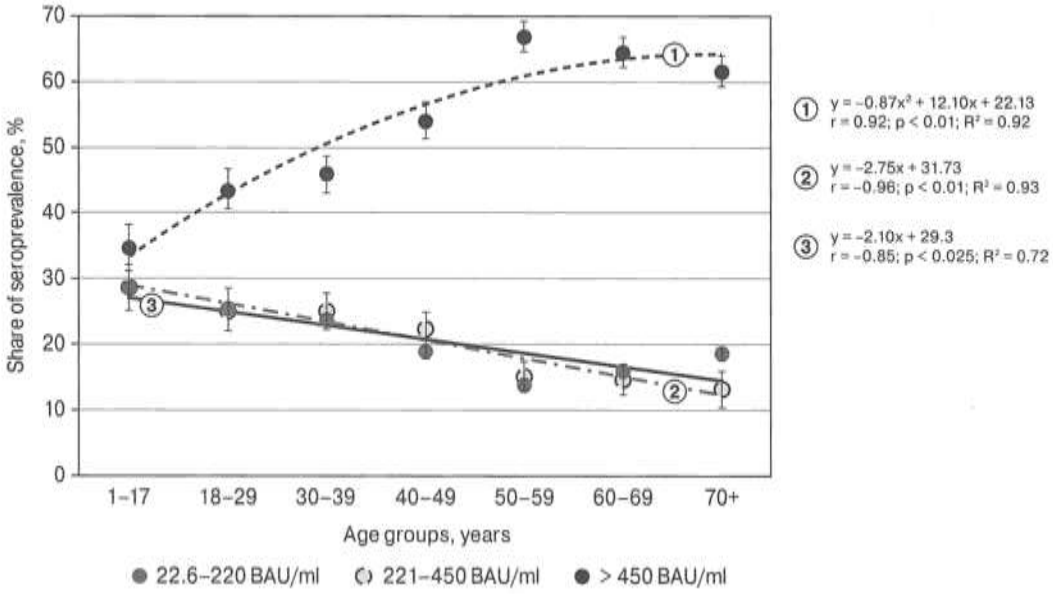


Figure 9. RBD antibody serological intervals plotted by age group

Note. Plasma Ab ranges are expressed in BAU/ml. Colored curves are trend lines for each Ab range. Regressions, rank correlation coefficients, p-values, and coefficients of determination are given (highlighted in the color of the corresponding range). Vertical black lines are 95% confidence intervals.

Upon reaching the maximum Nc Ab level (> 667 BAU/ml), the trend line for interage distribution of seropositivity transformed into an s-shaped 3rd degree polynomial curve described by the equation: $y = 0.51x^3 + 5.76x^2 - 16.15x + 26.30$. Several regions were clearly distinguishable on the regression curve: a depression among volunteers aged 18–29 years; a significant increase in the proportion of seropositive individuals aged 50 to 69 years; followed by a downward trend in the group 70+ years old (Fig. 8, Table 3S). The rank correlation was 0.76 ($p \cong 0.05$), and the determination coefficient was 0.98.

During analysis, seroprevalence distribution features were noted depending on age and plasma RBD concentration (Fig. 9, Table 4S). The minimum share of seropositivity was noted among individuals with RBD Abs in the range of 22.6–220 BAU/ml. The relationship between volunteer age and RBD seropositivity was described by the linear regression equation $y = -2.10x + 29.30$, with a determination coefficient $R^2 = 0.72$. As with Nc, the largest proportion of seropositive individuals with this RBD Ab level was found in the age group 1–17 years old (28.8%; 95% CI: 25.4–32.4). This proportion continuously decreased with increasing age, with an angular coefficient of 1.7. In the 50–59 age group, it reached 14.0% (95% CI: 11.9–16.3). By 70+ years, it increased by 6% to 20.4% (95% CI: 19.4–21.4; $p < 0.05$). The noted decrease was not accidental; the rank correlation coefficient was –0.85 ($p < 0.025$).

A similar relationship was found in the group of individuals with RBD Ab levels of 220–450 BAU/ml. Only the numerical values of the coefficients a and b changed. The coefficient of determination increased to 0.93, and the value of the rank correlation coefficient became –0.96 ($p < 0.001$). The main trend remained unchanged: a decrease in the proportion of seropositive individuals on the x-axis (ages from 1–17 to 70+), with a slope equal to –2.95. The correlation coefficient for these groups was –0.96 ($p < 0.01$).

Achievement of maximum RBD Ab levels (> 450 BAU/ml) was accompanied by a trend change from negative to positive. The linear regression was transformed into a 2nd order polynomial ($y = -0.87x^2 + 18.10x + 22.13$), while the coefficient of determination increased to 0.92. The observed change in the regression curve was also not random; the rank correlation coefficient was 0.92 ($p < 0.01$).

Analysis of RBD Ab levels showed (Fig. 9) that, in 34.8–66.9% of seropositive volunteers of different ages, levels exceeded 450 BAU/ml (the upper threshold of the test system). Among persons from 1 to 39years of age, the proportion of individuals with maximum RBD Ab levels was significantly below

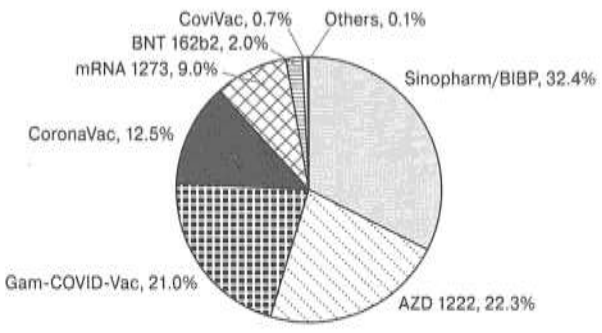


Figure 10. Vaccine usage structure in Armenia by share

Note. Others — the volunteer could not recall the name of the vaccine received.

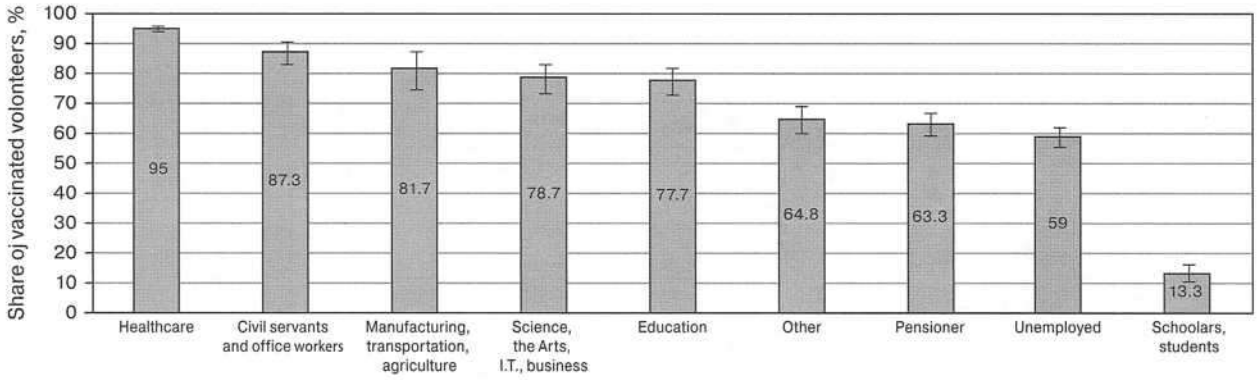


Figure 11. Vaccination coverage by professional group

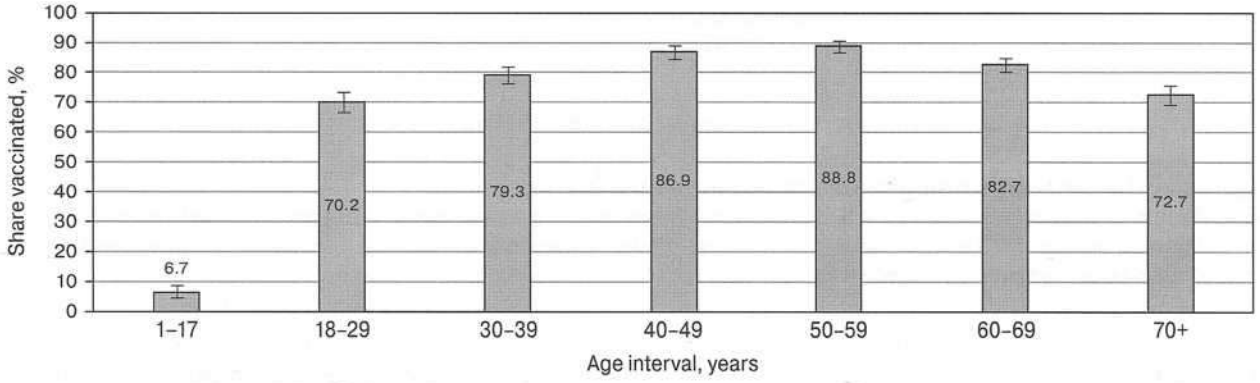


Figure 12. Vaccination coverage by age group

the cohort mean of 54.2% (95% CI: 52.9–55.5) at $p < 0.05$. In groups older than 40 years, the proportion of individuals with high RBD Ab levels (220–450 BAU/ml) was significantly higher than among volunteers aged 1 to 39 years ($p < 0.05–0.001$). A question arises: Do RBD Ab levels in older individuals (40–69 y.o.) reflect increased intensity of immunity formed in response to more frequent contact with the pathogenic agent? This cannot be ruled out, but the question requires a special study.

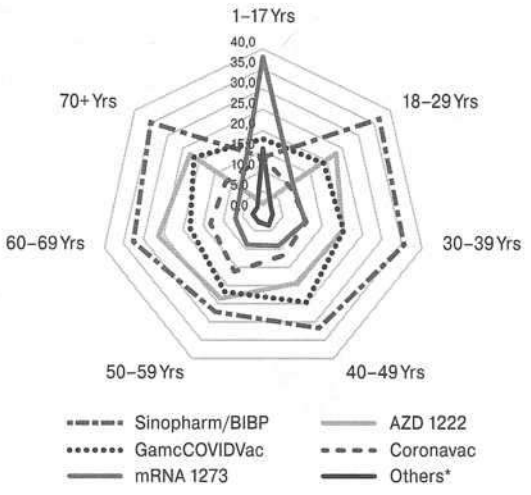


Figure 13. Distribution of the main vaccine types by age

Note. The group 'Other' combines the shares of individuals vaccinated with vaccines not shown (BNT162b2, mRNA-1273, EpiVacCorona, CoviVac, unknown).

Vaccination of volunteers

Vaccination of Armenian residents was carried out with a wide range of eight vaccines (Fig. 10). The Sinopharm/BIBP (inactivated whole-virion) vaccine was used most frequently, accounting for 32.4% (95% CI: 31.1–33.8). AZD1222 vaccine (22.3%) occupied 2nd place (10% lower usage). Gam-COVID-Vac was used slightly less frequently (21.0%). In total, these represented 75.7% of vaccinations (Fig. 10). The remaining vaccines accounted for 24.3%.

According to official data, about 38.1% of residents were vaccinated (Fig. 2) as a result of the vaccination campaign in the RA (as of April 2022). In the study cohort, the proportion vaccinated exceeded 70%. This is primarily due to the greater involvement of medical workers in the study, whose proportion in the cohort exceeded 30.0%. A second factor that likely influenced the high vaccination coverage in the cohort could be a greater interest in participation among vaccinated individuals wishing to clarify the status of their post-vaccination immunity. Such a pattern was noted in the surveyed cohort, where the share of fully vaccinated medical workers was 95.0% (95% CI: 94.1–95.9); this was significantly higher than in other professional groups ($p < 0.01$). Second place in terms of immunization coverage

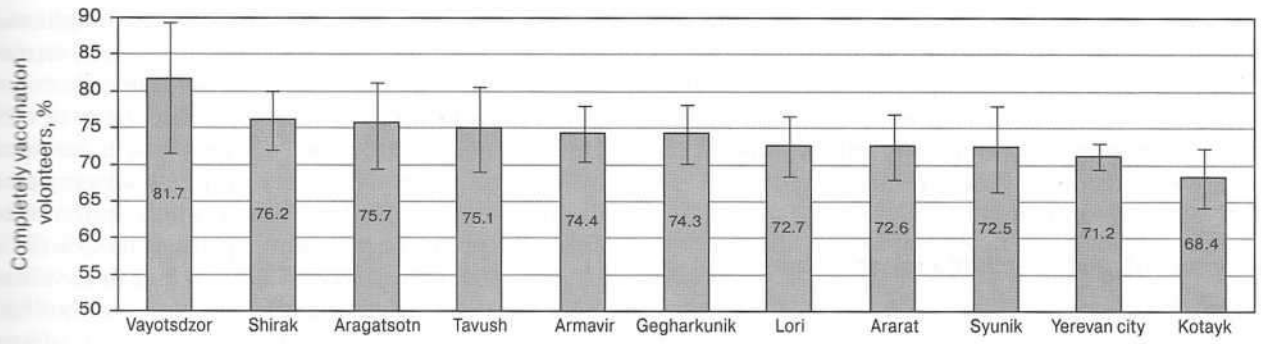


Figure 14. Share of completely vaccinated volunteers by region (as of 16/04/2022)
Note. The x-axis indicates region. Yerevan was considered like a region.

were civil service and office workers, among whom 87.3% (95% CI: 83.3–90.6) indicated a history of vaccination in the questionnaire (Fig. 11).

Among other active, working-age population groups, there was a slightly lower predisposition to vaccination among those from industrial enterprises (manufacturing, transportation, agriculture) to education workers. Lower vaccination coverage, reaching significance, was noted among pensioners and the unemployed ($p < 0.01$). Unsurprisingly, the lowest vaccination coverage was found among schoolchildren and students, 13.3% (95% CI: 10.6–16.5). This can apparently be explained by a certain prejudice against SARS-CoV-2 vaccination of children or adolescents in some strata of society. When assessing the age distribution of those vaccinated (Fig. 12), clear differences in vaccination level were seen. This partially explains the quantitative distribution of RBD Abs shown in Figure 9.

In the study cohort, the total vaccinated were 4395, or 72.6% (95% CI: 71.5–73.7). In the children's group, this indicator was expectedly the lowest, 6.7% (95% CI: 4.9–8.9). Among adults, it increased to 80.8% (95% CI: 79.7–81.8). Maximum vaccination coverage values were noted in the groups 40–49 y.o. (86.9%; 95% CI: 84.6–89.0) and 50–59 y.o. (88.8%; 95% CI: 86.7–90.7). Values were somewhat less among 18–29 y.o. (70.2%; 95% CI 66.7–73.6) and volunteers over 70 (72.7%; 95% CI: 69.5–75.7). The differences were significant ($p < 0.05$). With regard to specific vaccine types, the Chinese Sinopharm/BIBP inactivated vaccine was most frequently indicated by volunteers (Fig. 13). The majority of adult volunteers received this vaccine (32.6%; 95% CI: 31.2–34.0). Sinopharm was administered to children only in selected cases (13.3%; 95% CI: 5.1–26.8).

The AZD1222 vaccine and the Gam-COVID-Vac family of vaccines (Sputnik V, Sputnik Light) were less actively used. Total vaccination coverage with vector vaccines was equal to, or in some cases slightly more than, that of inactivated vaccines. The mRNA-1273 vaccine was used least often. However, it was used in 37.8% (95% CI: 23.8–53.5) of child vaccinations (Fig. 13).

Analysis of volunteer vaccination by Armenian region did not reveal significant differences (Fig. 14). Slightly higher values were noted in the Vayots Dzor region; the lowest were in the Kotayk region. Regional differences did not reach statistical significance.

When assessing the regional distribution of vaccines by platform type (inactivated whole-virion, vector, mRNA), the picture changed markedly (Fig. 15).

The distribution of volunteers receiving whole-virion preparations showed that inactivated vaccines prevailed in two of the eleven regions: Yerevan (the capital) and the Tavush region. In Yerevan, this predominance turned out to be significant ($p < 0.01$). In the rest of Armenia, vector vaccines were more popular, accounting for 40.34% (95% CI: 35.55–45.27) of the total vaccinated population. It should be noted that in 6 out of 11 regions, vector vaccines significantly prevailed over whole-virion types ($p < 0.05$). As for mRNA vaccines, their share was only 8.31% (95% CI: 5.83–11.42), hardly enough to have any significant impact on the level of post-vaccination immunity.

When summarizing the results, it can be seen that vaccination coverage turned out to be relatively uniform in terms of age, regional, and occupational

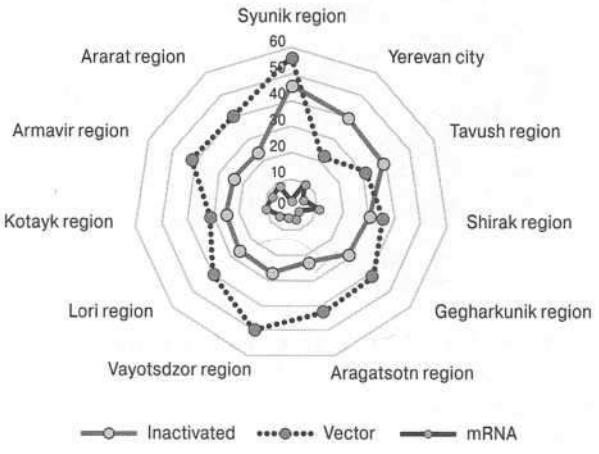


Figure 15. Regional distribution of vaccine usage (%) by production platform

characteristics. Among medical workers, however, the share vaccinated was significantly higher. When grouping vaccines by platform, vector vaccine predominance was noted in nine out of eleven Armenian regions. Yerevan and, to a lesser extent, Tavush region, were exceptions wherein inactivated whole-virion vaccines dominated.

Structure of post-vaccination specific humoral immunity

The results obtained, especially distributions with vaccines combined into separate platform categories, raised the inevitable question: Does the structure of elicited specific humoral immunity depend on platform (inactivated whole-virion, vector, mRNA)? The question stems foremost from the antigenic structure of the specific preparations. Inactivated whole-virion vaccines contain the entire spectrum of SARS-CoV-2 antigens, whereas vector and, especially, mRNA preparations contain only spike protein components or even RBD antigens [22]. With this in mind, we analyzed the structure of humoral immunity formed in response to usage of each vaccine type.

Table 3. Structure of SARS-CoV-2 Ab seroprevalence among volunteers immunized with inactivated whole-virion vaccines (Sinopharm/BIBP, CoronaVac, CoviVac; n = 2004)

	Number Nc+ % (95% CI)	Number Nc– % (95% CI)	Total % (95% CI)
RBD+	1886 94.1% (93.0–95.1)	55 2.7% (2.1–3.6)	1941 96.9% (96.0–97.6)
RBD–	39 2.0% (1.4–2.6)	24 1.2% (0.8–1.8)	63 3.1% (2.4–4.0)
Total	1925 96.1% (95.1–96.9)	79 3.9% (3.1–4.9)	2004 100%

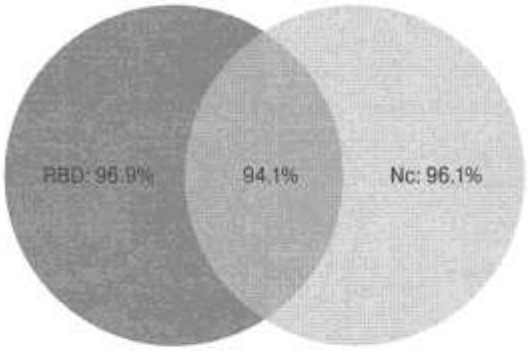


Figure 16. Structure of seropositivity (RBD, Nc) following completion of immunization with inactivated vaccines

Note. Right and left circles represent individuals seropositive for the Nc or RBD antigens, respectively. The central zone represents double-positive individuals (positive for both antigens).

As expected, the effect of the inactivated Sinopharm/BIBP vaccine containing all viral antigens was formation of a complete immune response (Table 3).

The vast majority of volunteers responded to vaccination with the formation of a full-fledged humoral immune response. Of the total cohort who completed immunization with inactivated whole-virion vaccines, the proportion Nc seronegative was 3.9% (95% CI: 3.1–4.9). Only 1.2% (95% CI: 0.8–1.8) of volunteers did not develop specific Abs upon immunization. Assessment of response distribution (shares of individuals positive for one or both antigens) indicates formation of a full-fledged immune response in the overwhelming number of vaccinated (Fig. 16).

A different predisposition of volunteers to vaccination was revealed with the vector vaccines AZD1222 and Gam-COVID-Vac. Their total share was 43.3% (95% CI: 41.8–44.8) (Table 4).

In response to the use of vector vaccines, the proportion Nc seropositive volunteers decreased significantly, while the proportion Nc seronegative increased significantly ($p < 0.001$, both cases).

Table 4. Structure of seropositivity among volunteers (n = 1902) immunized with the vector vaccines AZD1222 or Gam-COVID-Vac (Sputnik V, Sputnik Light)

	Number Nc+ % (95% CI)	Number Nc– % (95% CI)	Total % (95% CI)
RBD+	1675 88.1% (86.5–89.5)	161 8.5% (7.2–9.8)	1836 96.5% (95.6–97.3)
RBD–	42 2.2% (1.6–3.0)	24 1.3% (0.8–1.9	66 3.5% (2.7–4.4)
Total	1717 90.3% (88.8–91.6)	185 9.7% (8.4–11.1)	1902 100%

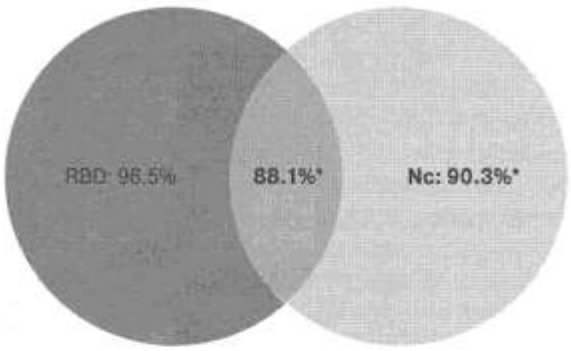


Figure 17. Structure of seropositivity (RBD, Nc) following completion of immunization with vector vaccines

Note. Right and left circles represent individuals seropositive for the Nc or RBD antigens, respectively. The central zone represents double-positive individuals (positive for both antigens). An asterisk indicates significantly lower compared to results with inactivated vaccines (Fig. 16).

Simultaneously with the decrease in the share Nc+, the percentage of double-seropositive (Nc+RBD+) volunteers decreased significantly ($p < 0.001$). The share of RBD+ practically did not change. This structure is likely due to the presence of only RBD antigen in the vector preparations. This is clearly seen when comparing Figures 16 and 17.

The proportion of volunteers immunized with mRNA vaccines was the smallest, amounting to only 11.1% (95% CI: 10.0–12.0) (Table 5).

The immune response to mRNA vaccines was characterized by a further decrease in the proportion of Nc+RBD+ double-seropositive volunteers (Table 5). Indeed, in response to whole-virion vaccines, 94.1% (95% CI: 93.0–95.1) of individuals were double-seropositive. After immunization with mRNA vaccines, it decreased to 86.3% (95% CI: 83.0–89.3) at $p < 0.0001$. This is foremost due to a significant decrease in the proportion of people with an Nc antigen response ($p < 0.0001$). This is expected since mRNA vaccines contain only mRNA encoding spike protein antigens [22]. Naturally, there were no grounds to expect a decreased RBD antigen response (Fig. 18).

The data presented in this section confirm the current view that the antigenic composition of any vaccine is a determining factor in its effectiveness. Thus, the maximum immune response in our studies was obtained in response to whole-virion inactivated vaccines, in contrast to vector and, especially, mRNA preparations.

Discussion

The conducted cross-sectional, randomized study showed that by mid-April 2022, the total SARS-CoV-2 seroprevalence in the Armenian population included in the study reached 98.4% (95% CI 98.1–98.7). This significantly exceeds the previously postulated threshold beyond which epidemic spread of a pathogenic virus stops [18, 22]. As expected, statistics provided by global sources show that after 15/04/2022, COVID-19 incidence in the RA decreased to almost zero, manifesting only in the form of individual sporadic cases in the subsequent period [3, 6, 12, 17].

Seropositivity values for individual Abs in men were: 92.8% to Nc (95% CI: 92.1–93.4) and 94.9% to RBD (95% CI: 94.3–95.4). Seropositivity among women was significantly higher than in men: Nc Abs — 93.4% (95% CI: 92.7–94.1) and RBD Abs — 95.8% (95% CI: 95.2–96.3). At the time of the study, there were no differences among volunteers by age or occupational status. Seroprevalence structures (Nc, RBD) also did not show any significant differences among volunteers by region of residence (Fig. 19, see cover II).

When assessing quantitative plasma Ab content, it was found that among Nc+ volunteers, Ab levels below 17 BAU/ml were found in less than 10% of individuals. The remaining volunteers were evenly distributed over different serological intervals in almost all age groups. In volunteers of different ages, RBD Ab levels exceeded 450 BAU/ml (the upper sensitivity threshold of the test system) in 35–67% of cases. In the group older than 40 years, the proportion of such persons was significantly higher than among persons from 1 to 39 years old (Fig. 8, 9).

It can be assumed that such a high level of collective immunity is determined by several significant factors. Firstly, 422 900 people (22.3% of the population) fell ill with overt COVID-19 during the pandemic [3, 6, 12]. Secondly, active vaccination played a role, thanks to which the total number immunized in the RA amounted to 1.1 million individuals or 38.1% of the population. In total, this amounted to 60.5%, enough to significantly impede the epidemic process [9, 18].

In the study cohort of adult volunteers, the proportion vaccinated was 80.8% (95% CI 79.7–81.8). The maximum vaccination coverage was observed among persons 40–49 years old (86.9%; 95% CI:

Table 5. Structure of seropositivity among volunteers (n = 485) immunized with the mRNA vaccines mRNA-1273 or BNT162b2

	Number Nc+ % (95% CI)	Number Nc– % (95% CI)	Total % (95% CI)
RBD+	419 86.3% (83.0–89.3)	47 9.7% (7.2–12.6)	466 96.1% (93.9–97.6)
RBD–	15 3.1% (1.7–5.1)	4 0.8% (0.2–2.1)	19 3.9% (2.4–6.1)
Total	434 89.5% (86.4–92.1)	51 10.5% (7.9–13.6)	485 100%

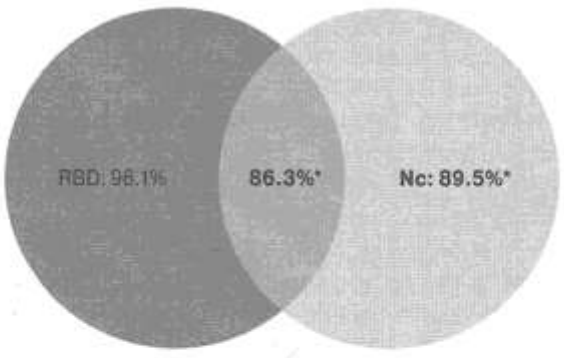


Figure 18. Structure of seropositivity (RBD, Nc) following completion of immunization with mRNA vaccines

Note. Right and left circles represent individuals seropositive for the Nc or RBD antigens, respectively. The central zone represents double-positive individuals (positive for both antigens). An asterisk indicates significantly lower compared to results with inactivated vaccines (Fig. 16).

84.6–89.0) and 50–59 years old (88.8%; 95% CI: 86.7–90.7). The minimums were among those 18–29 years old (70.2%; 95% CI: 66.7–73.6) and those 70+ (72.7%; 95% CI: 69.5–75.7) (Fig. 11). Among occupational groups, healthcare workers were almost completely vaccinated (95.0%; 95% CI: 94.1–95.9) (Fig. 12).

The whole-virion, inactivated Sinopharm/BIBP vaccine prevailed in the structure of vaccines used, with a share of 32.4%. CoronaVac and CoviVac were used less frequently (12.5% and 0.7%, respectively). In total, these designs amounted to 45.6%. In second place were the vector vaccines AZD1222 and Gam-COVID-Vac (Sputnik V, Sputnik Light), together accounting for 41.3%. Vaccines on the mRNA platform (mRNA-1273, BNT162b2) were used for immunization in 11% of cases. Whole-virion inactivated vaccines and vector vaccines were used for immunization mainly in the adult population, while the mRNA-1273 vaccine was more often used in children (Fig. 13).

All vaccines used were characterized by high efficiency in relation to the production of RBD Abs, 96.6% (95% CI: 96.1–97.1). Nucleocapsid Ab seroprevalence depended on the type of vaccine received. This indicator was higher with whole-virion vaccines (96.0%; 95% CI: 95.1–96.8), compared to vector vaccines (90.2%; 95% CI: 88.9–91.5), mRNA vaccines (89.5%; 95% CI: 86.4–92.1), or unvaccinated volunteers (90.2%; 95% CI: 88.7–91.6). The presence of Nc Abs in individuals immunized with vector or mRNA vaccines indicates that about 90.0% of such volunteers had likely experienced COVID-19 or perhaps asymptomatic infection.

The results show that the adaptive humoral immunity of volunteers, formed in response to the use of various vaccines of different origin, had a number of differences. After completion of full immunization, inactivated vaccine usage resulted in the largest proportion of double-seropositive individuals compared with other preparations (differences significant, $p < 0.001$). The lowest proportion of double-seropositive individuals was noted with usage of the mRNA-1273 preparation. This is likely related to a lower share of Nc+ individuals, which was significantly different when using vector or mRNA vaccines versus inactivated whole-virion preparations. It should also be noted that the vaccines used generated the same proportions of RBD seropositive. The reason for the noted features seems to be that inactivated vaccines contain the maximum set of viral antigens by design, unlike vector or especially mRNA preparations [22].

Conclusion

The results obtained indicate that the collective immunity of the Armenian population was close to 100% at the time of the study. There were no strong correlations with volunteer age, occupational status, or regional affiliation. Seropositivity was a hybrid phenomenon resulting from both a high number of convalescents and high vaccination coverage [4]. In almost 90.0% of volunteers, serological status reflected the simultaneous presence of antibodies to both antigens (Nc, RBD). Double positive status was understandably highest in convalescents who had received whole-virion vaccines at some point. It can be stated that the population of the Republic has reached the maximum level of collective immunity, a necessary prerequisite for stopping the epidemic spread of COVID-19.

Limitations of the study

The authors would like to note several factors that could affect the representativeness of the sample or the analytical results. Despite the fact that the information campaign was carried out as widely as possible for the population (state television channels, news sites, Facebook), there is a problem of limited internet access for parts of the rural population. In addition, residents who are more responsible for their health and the health of their loved ones (primarily women and healthcare workers) are more likely to take part in studies of this kind. Healthcare workers feature heightened awareness due to frequent contacts with COVID-19 patients. Since the study included an assessment of post-vaccination immunity, vaccinated residents were also more interested in participating. As such, the volunteer cohort's vaccination coverage was likely significantly higher than the national average. These factors may have resulted in greater representation of women, healthcare workers, and vaccinated residents.

Supplementary materials

Table 1S. Volunteer Questionnaire; Table 2S. Distribution of volunteers by occupation; Table 3S. Age distribution of seropositive volunteers by quantitative Nc Ab content; Table 4S. Age distribution of seropositive volunteers by quantitative RBD Ab content; Table 5S. Age distributions for the main vaccine types used. Tables are available at: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SCI-2450.

Author contributions

AYP, AVV — research planning and direction; AAT, NGB, RAA, SAE — research planning and coordination; AAM, GGM — organization of laboratory research; IVD, GOP, ASK — collection and sorting of laboratory samples; TVA, OVZ, OAP, AVG, APR — sorting and laboratory testing of samples; VAI — primary processing and analysis of results; VSS — statistical analysis of the results and preparation of the manuscript; AAT, SAE — approv-

al of the manuscript; ESR — translation into English and editing.

Data availability statement

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and/or its Supplementary Materials.

Acknowledgments

The authors are grateful to E.S. Glazkova for technical assistance in laboratory research.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Agresti A., Coull B.A. Approximate is better than "exact" for interval estimation of binomial proportions. *Am. Stat., 1998, vol. 52, pp. 119–126. doi: 10.2307/2685469*
2. Calculation of the required sample size. In: Batrakova L.G. Statistics theory. 2009. *URL: https://docplayer. com.28880846-L-g-batrakova-teoriya-statistiki (01.04.2022)*
3. Coronavirus Monitor. *URL: https://coronavirus-monitor.info (14.10.2022)*
4. Crotty S. Hybrid immunity. *Science. 2021. vol. 372, no. 6549, pp. 1392–1393. doi: 10.1126/science*
5. Fiolet T., Kherabi Y., MacDonald C.J., Ghosn J., Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin. Microbiol. Infect., 2022, vol. 28, no. 2, pp. 202–221. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.005*
6. GOGOV. 2022. *URL: https://gogov.ru/covid-v-stats/armeniya (20.10.2022)*
7. Haas E.J., Angulo F.J., McLaughlin J.M., Anis E., Singer S.R., Khan F., Brooks N., Smaja M., Mircus G., Pan K., Southern J., Swerdlow D.L., Jodar L., Levy Y., Alroy-Preis S. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet, 2021, vol. 397, no. 10287, pp. 1819–1829. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00947-8*
8. Hassine I.H. Covid-19 vaccines and variants of concern: a review. *Rev. Med. Virol., 2022, vol. 32, no. 4: e2313. doi: 10.1002/rmv.2313*
9. Hernández C.R., Moreno J.C.S. Inmunidad frente a SARS-CoV-2: caminando hacia la vacunación Revista Española de Quimioterapia. *Rev. Esp. Quimioter., 2020. doi: 10.37201/req/086.2020*
10. Indari O., Jakhmola S., Manivannan E., Jha H.C. An update on antiviral therapy against SARS-CoV-2: how far have we come? *Front. Pharmacol., 2021, vol. 12: 632677. doi: 10.3389/fphar.2021.632677*
11. Li J., Jia H., Tian M., Wu N., Yang X., Qi. J., Ren W., Li. F., Bian H. SARS-CoV-2 and emerging variants: unmasking structure, function, infection, and immune escape mechanisms. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2022, vol. 12: 869832. doi: 10.3389/fcimb.2022.869832*
12. Our world in data. *URL: https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer (14.09.2022)*
13. Popova A.Y., Kasymov O.T., Smolenski V.Y., Smirnov V.S., Egorova S.A. Nurmatov Z.S., Milichkina A.M., Suranbaeva G.S., Kuchuk T.E., Khamitova I.V., Zueva E.V., Ivanov V.A., Nuridinova Z.N., Derkenbaeva A.A., Drobyshevskaya V.G., Sattarova G.Z., Kaliev M.T., Gubanova A.V., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Verbov V.N., Likhachev I.V., Krasnov A.V., Totolian A.A. SARS-CoV-2 herd immunity of the Kyrgyz population in 2021. *Med. Microbiol. Immunol., 2022, vol. 211, no. 4, pp. 195–210. doi: 10.1007/s00430-022-00744-7*
14. Popova A.Yu., Tarasenko A.A., Smolenskiy V.Yu., Egorova S.A., Smirnov V.S., Dashkevich A.M., Svetogor T.N., Glinskaya I.N., Skuranovich A.L., Milichkina A.M., Dronina A.M., Samoilovich E.O., Khamitova I.V., Semeiko G.V., Amvrosyeva T.V., Shmeleva N.P., Rubanik L.V., Esmanchik O.P., Karaban I.A., Drobyshevskaya V.G., Sadovnikova G.V., Shilovich M.V., Podushkina E.A., Kireichuk V.V., Petrova O.A., Bondarenko S.V., Salazhkova I.F., Tkach L.M., Shepelevich L.P., Avtukhova N.L., Ivanov V.A., Babilo A.S., Navyshnaya M.V., Belyaev N.N., Zueva E.V., Volosar L.A., Verbov V.N., Likhachev I.V., Zagorskaya T.O., Morozova N.F., Korobova Z.R., Gubanova A.V., Totolian Areg A. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Republic of Belarus amid the COVID-19 pandemic. *Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 887–904. doi: 10.15789/2220-7619-HIT-1798*
15. Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic. *Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 609–616. doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770*
16. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for coronavirus 2019 (COVID-19) infection. *URL: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.2 (20.04.2022)*
17. Public Health and Social Measures in Response to COVID-19. *URL: https://phsm.euro.who.int/countries/3 (21.09.2022)*
18. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity, 2020, vol. 52, no. 5, pp. 737–741. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.012*
19. Schwab K., Malleret T. COVID-19: the Great Reset. *Geneva (Switzerland): World Economic Forum, 2020.*
20. Significant Difference Calculator (z-test). RADAR Research Company. 2020. *URL: https://radar-research.ru (18.04.2022)*
21. Şimşek-Yavuz S., Komsuoğlu Çelikyurt F.I. An update of anti-viral treatment of COVID-19. *Turk. J. Med. Sci., 2021, vol. 51, no. SI-1, pp. 3372–3390. doi: 10.3906/sag-2106-250*
22. Totolian A.A., Smirnov V.S., Krasnov, A.A, Ramsay E.S., Dedkov V.G., Popova A.Yu. COVID-19 case numbers as a function of regional testing strategy, vaccination coverage, and vaccine type. *Preprint. 2022. doi: 10.21203/rs.3.rs-2183670/v1*
23. Wald A., Wolfowitz J. Confidence limits for continuous distribution functions. *Ann. Math. Stat., 1939, vol. 10, no. 2, pp. 105–118.*
24. Wang X., Zhao X., Song J., Wu J., Zhu Y., Li M., Cui Y., Chen Y., Yang L., Liu J., Zhu H., Jiang S., Wang P. Homologous or heterologous booster of inactivated vaccine reduces SARS-CoV-2 Omicron variant escape from neutralizing antibodies. *Emerg. Microbes Infect., 2022, vol. 11, no. 1, pp. 477–481. doi: 10.1080/22221751.2022.2030200*

25. Wang R., Chen J., Gao K., Wei G.W. Vaccine-escape and fast-growing mutations in the United Kingdom, the United States, Singapore, Spain, India, and other COVID-19-devastated countries. *Genomics, 2021, vol. 113, no. 4, pp. 2158–2170. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.05.006*
26. Yan W., Zheng Y., Zeng X., He B., Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct. Target Ther., 2022, vol. 7, no. 1: 26. doi: 10.1038/s41392-022-00884-5*

Авторы:
Попова А.Ю., д.м.н., профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;
Смирнов В.С., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Егорова С.А., д.м.н., зам. директора по инновациям ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Ванян А.В., к.м.н., генеральный директор ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;
Миличкина А.М., к.м.н., главный врач медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Бакунц Н.Г., зам. генерального директора ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;
Дрозд И.В., к.б.н., зав. центральной клинико-диагностической лабораторией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Абовян Р.А., начальник отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;
Иванов В.А., IT-аналитик ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Мелик-Андреасян Г.Г., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе филиала «Референс Лабораторный Центр» ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;
Рэмзи Э.С., научный аналитик ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Палозян Г.О., врач-эпидемиолог отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;
Арбузова Т.В., младший научный сотрудник группы эпидемиологического мониторинга и прогнозирования ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Кешишян А.Ш., к.м.н., зав. лаборатории паразитологии филиала «Референс Лабораторный Центр» ГНКО Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний МЗ РА, Ереван, Армения;
Жимбаева О.Б., врач Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Петрова О.А., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Губанова А.В., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Разумовская А.П., врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Тотолян Арег А., д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Popova A.Yu., DSc (Medicine), Professor, Head of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;
Smirnov V.S., DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Egorova S.A., DSc (Medicine), Deputy Director for Innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Vanyan A.V., PhD (Medicine), General Director, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;
Milichkina A.M., PhD (Medicine), Head Physician of the Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Bakunts N.G., Deputy-Director General, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;
Drozd I.V., PhD (Biology), Head of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Abovyan R.A., Head of the Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;
Ivanov V.A., IT analyst, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Melik-Andreasyan G.G., DSc (Medicine), Professor, Deputy-Director for Scientific Work, "Referens Laboratory Center" Branch, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;
Ramsay E.S., Science Analyst, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Palozyan G.H., Epidemiologist, Department of Epidemiology of Communicable and Non-Communicable Diseases, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;
Arbuzova T.V., Junior Researcher, Epidemiological Monitoring and Forecasting Group, St. Petersburg, Russian Federation;
Keshishyan A.S., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Parasitology, "Referens Laboratory Center" Branch, National Center of Disease Control and Prevention of the Ministry of Health of Armenia, Yerevan, Armenia;
Zhimbayeva O.B., Physician, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Petrova O.A., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Gubanova A.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Razumovskaya A.P., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian Areg A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.01.2023
Принята к печати 12.02.2023

Received 24.01.2023
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 91–99

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 91–99

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ГИПЕРВИРУЛЕНТНОГО СУБТИПА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING 14717-15

И.В. Мокроусов[1], А.А. Вязовая[1], М.В. Бадлеева[2], А.А. Герасимова[1], О.Б. Белопольская[3], А.Э. Машарский[3], И.В. Костюкова[4], С.Н. Жданова[5], Р.С. Мударисова[1], И. Авадэний[1,6], Н.С. Соловьева[6], Д.А. Найзабаева[7,8], Ю.А. Скиба[7], В.Ю. Журавлев[6], О.А. Пасечник[9], О.Б. Огарков[5]

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия, Россия*
[3] *РЦ «Центр Биобанк» — Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия*
[4] *БУЗОО Клинический противотуберкулезный диспансер, г. Омск, Россия*
[5] *ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия*
[6] *ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия*
[7] *Филиал Национального центра биотехнологии в г. Алматы, г. Алматы, Казахстан*
[8] *Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан*
[9] *ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия*

Резюме. Цель исследования — разработка метода для выявления штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, относящихся к высоколетальному, гипервирулентному и мультирезистентному кластеру Beijing 14717-15 и его применение для скрининга ретроспективных коллекций *M. tuberculosis* из различных регионов России. Изученная коллекция включала образцы ДНК *M. tuberculosis*, собранные в результате популяционных исследований. Сполиготипирование и генотипирование 24 локусов вариабельного числа тандемных повторов проводили по стандартным протоколам. Филогенетический анализ проводили на основе данных полногеномного секвенирования. Полиморфизм в геномной позиции 2423040 A > G, специфический для кластера Beijing 14717-15 (согласно номенклатуре MIRU-VNTRplus.org), выявляли с использованием метода ПЦР-ПДРФ и рестриктазы HhaI. Проведенный биоинформационный и филогенетический анализ данных полногеномного секвенирования 205 штаммов ранней древней сублинии генотипа Beijing *M. tuberculosis* показал, что штаммы с профилем VNTR 14717-15 и близкие ему группировались в монофилетический кластер родственных штаммов, который мы определили как Beijing 14717-15-кластер. Среди SNP, специфичных для кластера 14717-15, мы выбрали функционально нейтральный SNP в геномной позиции 2423040 A > G (*Rv2161c* Val33Ala) и разработали метод его детекции в формате ПЦР-ПДРФ. Далее этот метод был применен для скрининга коллекций ДНК из регионов Европейской и Азиатской частей России и стран Азии. Результаты демонстрируют присутствие штаммов

Адрес для переписки:
Мокроусов Игорь Владиславович
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (812) 644-63-80.
E-mail: imokrousov@mail.ru

Contacts:
Igor V. Mokrousov
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 644-63-80.
E-mail: imokrousov@mail.ru

Для цитирования:
Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Бадлеева М.В., Герасимова А.А., Белопольская О.Б., Машарский А.Э., Костюкова И.В., Жданова С.Н., Мударисова Р.С., Авадэний И., Соловьева Н.С., Найзабаева Д.А., Скиба Ю.А., Журавлев В.Ю., Пасечник О.А., Огарков О.Б. Молекулярная детекция и филогеография гипервирулентного субтипа Mycobacterium tuberculosis Beijing 14717-15 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 91–99. doi: 10.15789/2220-7619-MDA-2082

Citation:
Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., Badleeva M.V., Gerasimova A.A., Belopolskaya O.B., Masharsky A.E., Kostyukova I.V., Zhdanova S.N., Mudarisova R.S., Avadenii I., Solovieva N.S., Naizabayeva D.A., Skiba Yu.A., Zhuravlev V.Yu., Pasechnik O.A., Ogarkov O.B. Molecular detection and phylogeography of the hypervirulent subtype of Mycobacterium tuberculosis Beijing 14717-15 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 91–99. doi: 10.15789/2220-7619-MDA-2082

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант 19-14-00013).

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 19-14-00013).

© Мокроусов И.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MDA-2082

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

кластера Beijing 14717-15 только в Азиатской части России с пиком в Бурятии (18%). Таким образом, нами разработан метод детекции гипервирулентного и высоколетального генетического кластера *M. tuberculosis* Beijing 14717-15 на основе выявления специфической мутации в гене *Rv2161c* с помощью ПЦР с последующей HhaI-рестрикцией продукта ПЦР и электрофорезом в агарозном геле для дискриминации дикого и мутантного аллелей. Преимуществами предлагаемого способа являются быстрота, простая и однозначная интерпретация результатов, возможность выявления контаминации и микст-инфекции, пригодность для производительного анализа больших коллекций штаммов *M. tuberculosis*.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis, полногеномное секвенирование, вирулентность, генотип Beijing, множественная лекарственная устойчивость.*

MOLECULAR DETECTION AND PHYLOGEOGRAPHY OF THE HYPERVIRULENT SUBTYPE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING 14717-15

Mokrousov I.V.[a], Vyazovaya A.A.[a], Badleeva M.V.[b], Gerasimova A.A.[a], Belopolskaya O.B.[c], Masharsky A.E.[c], Kostyukova I.V.[d], Zhdanova S.N.[e], Mudarisova R.S.[a], Avadenii I.[a,f], Solovieva N.S.[f], Naizabayeva D.A.[g,h], Skiba Yu.A.[g], Zhuravlev V.Yu.[f], Pasechnik O.A.[i], Ogarkov O.B.[d]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *Dorzhi Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude, Buryatia, Russian Federation*
[c] *Resource Center "Bio-bank Center", Research Park of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation*
[d] *Clinical Anti-tuberculosis Dispensary, Omsk, Russian Federation*
[e] *Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation*
[f] *St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation*
[g] *Almaty Branch of National Center for Biotechnology, Almaty, Kazakhstan*
[h] *Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan*
[i] *Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation*

Abstract. Aim. To develop a method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* strains belonging to highly lethal, hypervirulent, multidrug-resistant Beijing 14717-15-cluster to be applied to screen for *M. tuberculosis* retrospective collections obtained from various regions of Russia. The collection included *M. tuberculosis* DNA samples obtained during population studies. Spoligotyping and genotyping of 24 variable number tandem repeats loci were performed according to standard protocols. Phylogenetic analysis was based on the whole genome sequencing data. Polymorphism at the genomic position 2423040 A > G, specific for the Beijing 14717-15 cluster, was detected using PCR-RFLP and HhaI restriction enzyme. The bioinformatic and phylogenetic analysis of whole genome sequencing data for 205 strains of the early ancient sublineage of the *M. tuberculosis* Beijing genotype showed that strains with the VNTR 14717-15 profile (according to MIRU-VNTRplus.org) and those close to it were grouped into one monophyletic cluster of related strains, which we defined as Beijing 14717-15-cluster. Among the SNPs specific for the 14717-15 cluster, we chose a functionally neutral SNP at the genomic position 2423040 A > G (*Rv2161c* Val33Ala) and developed a method for its detection in the PCR-RFLP format. Next, we applied this method to screening DNA collections from the regions of the European and Asian parts of Russia and Asian countries. The data demonstrate the presence of strains of the Beijing 14717-15 cluster only in the Asian region of Russia peaking in Buryatia (18%). We have developed a method for detection of the hypervirulent and highly lethal genetic cluster *M. tuberculosis* Beijing 14717-15 based on detection of the specific mutation in the *Rv2161c* gene using PCR followed by HhaI restriction of the PCR product and agarose gel electrophoresis to discriminate between wild-type and mutant alleles. The advantages of the proposed method are the speed, simple and unambiguous data interpretation, opportunity to detect contamination and mixed infection, suitability for efficient analysis of large collections of *M. tuberculosis* strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, whole genome sequencing, virulence, Beijing genotype, multidrug resistance.*

Введение

Патобиология штамма (устойчивость к антибиотикам, вирулентность, выживаемость, иммуногенность) является ключевым фактором формирования структуры популяции *Mycobacterium tuberculosis*, которая, в свою очередь, определяет эпидемическую ситуацию по туберкулезу. Клиническая значимость структуры популяции *M. tuberculosis* состоит в том, что отдельные генетические варианты имеют большее клиническое и/или эпидемиологическое значение, чем другие. Вид *M. tuberculosis* включает несколько крупных филогенетических линий, и генотип Beijing (основной компонент Восточно-Азиатской линии) является одним из наиболее изученных [6, 9, 11]. Генотип Beijing разделяют на две ветви или сублинии — более гетерогенную предковую/древнюю и эволюционно более молодую современную. Предыдущие исследования показали связь сублиний Beijing с различными патологическими

и клиническими проявлениями, которые влияют на трансмиссивность конкретных штаммов в человеческих популяциях. В рамках генотипа Beijing его древние и современные штаммы различаются по вирулентности, что также частично зависит от происхождения штамма.

Современная сублиния распространена по всему миру и включает несколько хорошо известных эпидемических или эндемических генетических кластеров штаммов. Напротив, штаммы древней сублинии генотипа Beijing редко встречаются за пределами Восточной Азии. Недавно два генетических кластера этой сублинии были обнаружены в азиатской части России (типы 1071-32 и 14717-15, согласно номенклатуре ресурса MIRU-VNTRplus.org), и оба были ассоциированы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [14]. Положение данных кластеров в рамках глобальной филогении генотипа Beijing показано на рис. 1. Один из кластеров, обозначенный как 1071-32, относительно распространен в Омске, Сибирь (7%), и встречается спорадически в разных регионах России с середины 1990-х гг., также его единичные изоляты выявлены в Восточной и Южной Европе [15]. Второй кластер 14717-15 был обнаружен только в азиатской части России, где он показал нарастающий градиент от 2,6% в Омске, Западная Сибирь, до 16% в Бурятии, Дальний Восток [13].

В мышиной модели штаммы этих кластеров проявили противоположные свойства [21]. Штамм 396 (14717-15-кластер из Бурятии, Дальний Восток) приводил к очень высокой смерт-

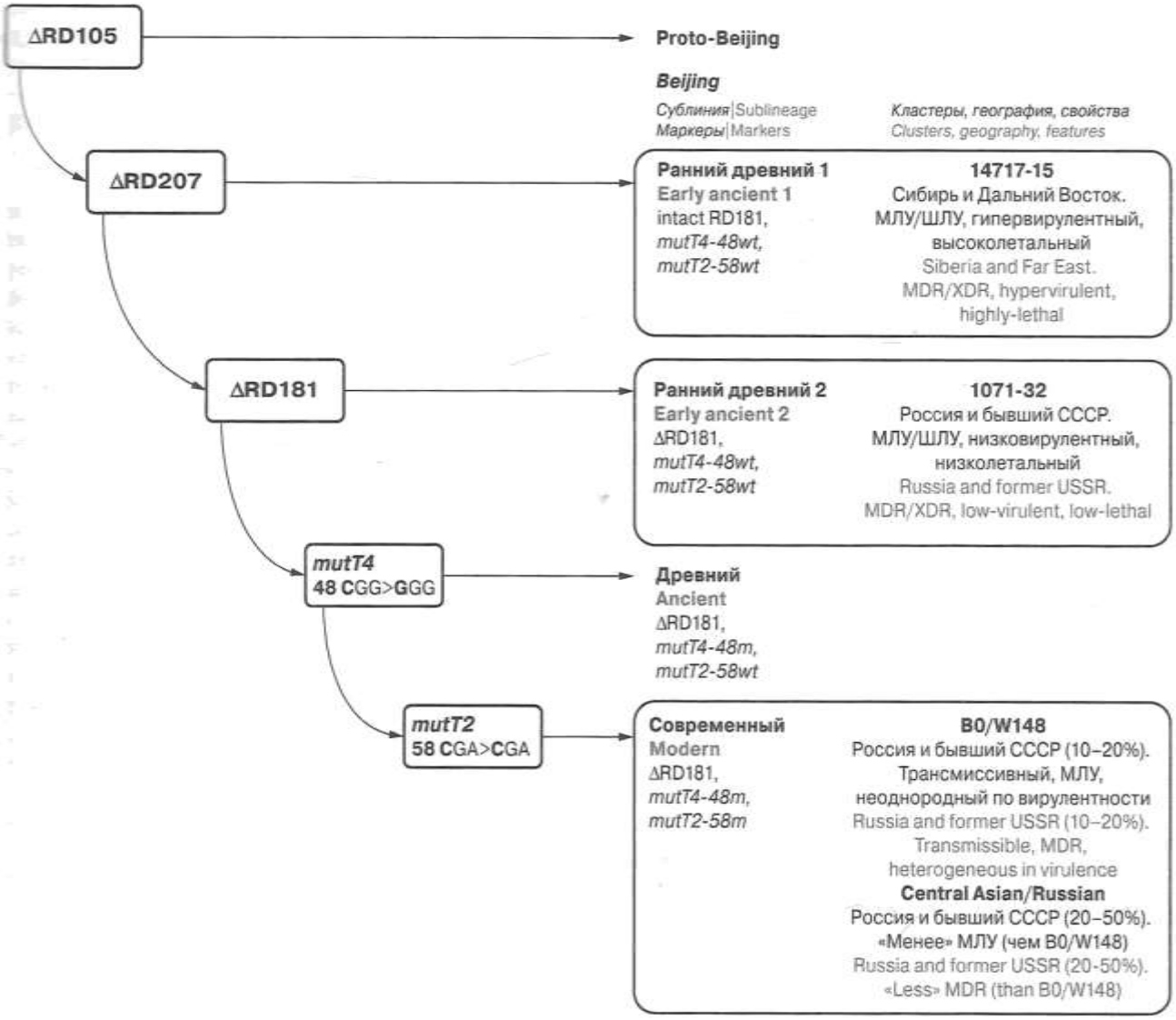


Рисунок 1. Схема эволюции генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis*, включая основные российские субтипы

Figure 1. Scheme of the evolution of the Beijing *Mycobacterium tuberculosis* genotype, including the main Russian subtypes

ности, большей потере веса, более высокой бактериальной нагрузке и более тяжелой патологии легких. Сравнение с опубликованными данными по другим российским эпидемическим штаммах генотипа Beijing (B0/W148, CAO, Central Asian/Russian [1]), показало, что штамм 396 продемонстрировал наивысшую смертность, таким образом являясь наиболее летальным (в мышиной модели) российским штаммом *M. tuberculosis*. При этом ретроспективное исследование больных в Омской области показало, что группа пациентов, инфицированных кластером Beijing 14717-15, имела и самую высокую долю летального исхода по сравнению с другими группами [12].

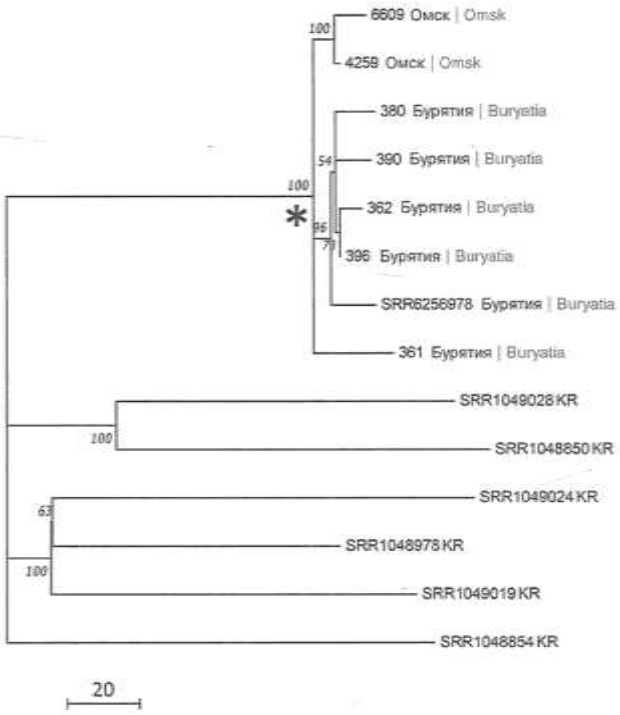


Рисунок 2. Дендрограмма штаммов древней сублинии генотипа Beijing из России и Кореи, построенная на основе полногеномых SNP с использованием алгоритма максимального правдоподобия

Figure 2. Dendrogram of strains of the ancient sublineage of the Beijing genotype from Russia and Korea, built on the basis of whole genome SNPs based on the maximum likelihood algorithm

Примечание. Ветвь, включающая штаммы Beijing 14717-15-кластера, отмечена звездочкой. Шкала показывает количество SNP. Цифры курсивом рядом с узлами показывают процент бутстрапа. KR — Корея (в номере штамма).

Note. The branch containing strains of the Beijing 14717-15 cluster is marked with an asterisk. The scale shows the number of SNPs. The numbers in italics next to the nodes show the bootstrap percentage. KR — Korea (in the strain number).

Сейчас становится очевидным, что при внедрении персонализированного лечения туберкулеза следует учитывать не только лекарственную устойчивость, но и вирулентность штамма *M. tuberculosis*, что требует разработки методов быстрой детекции значимых гипервирулентных геновариантов. Выявление штаммов кластера Beijing 14717-15 возможно с использованием полногеномного секвенирования или генотипирования по 24 локусам VNTR с последующим сравнением с базой данных www.MIRU-VNTRplus.org [13, 14].

Цель исследования — разработка простого метода для выявления штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к высоколетальному, гипервирулентному и мультирезистентному кластеру Beijing 14717-15 и применение метода для скрининга ретроспективных коллекций ДНК *M. tuberculosis* из различных регионов России.

Материалы и методы

Изученная коллекция включала образцы ДНК *M. tuberculosis*, собранные в период с 2015 по 2022 гг. в результате популяционных исследований. Выделение ДНК из культуры *M. tuberculosis*, выращенной на среде Левенштейна–Йенсена, проводили по van Embden и соавт. [20] с использованием лизоцима, протеиназы К, додецилсульфата натрия и цетилтриметиламмонийбромида с последующей экстракцией с использованием смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1), центрифугированием, осаждением изопропанолом, промывкой 70% этанолом и растворением осадка в 30–50 мкл буфера ТЕ х1.

Сполиготипирование проводили по стандартному протоколу с использованием изготовленной в нашей лаборатории мембраны с иммобилизованными 43 олигонуклеотидами [5]. Генотип Beijing был идентифицирован экспериментально или *in silico* на основе определения делеции RD207 (позиции 3120521–3127920 в геноме H37Rv, NC_000962.3). Генотипирование 24 локусов MIRU-VNTR проводили по Supply и соавт. [19], полученные числовые профили сравнивали с ресурсом MIRU-VNTRplus.org.

Филогенетический анализ штаммов древней сублинии генотипа Beijing на основе данных полногеномного секвенирования, полученных в нашей лаборатории (депонированы в SRA NCBI под номерами проектов PRJNA822891, PRJNA489691) или извлеченных из архива коротких прочтений SRA NCBI, был описан ранее [13]. Пакет Geneious 9.0 (Biomatters Ltd) использовали для картирования ридов на геном референтного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (NC_00962.3). Онлайн-ресурс SAM-TB (https://samtb.uni-medica.com/index) использовали для

анализа геномных данных, определения SNP и филогенетического анализа. Пакет MEGA7 [7] использовали для визуализации дендрограмм.

Полиморфизм в геномной позиции 2423040 A > G (позиция в гене *Rv2161c* 98T > C, аминокислотная замена Val(s)33Ala GTG/GCG), специфический для кластера Beijing 14717-15 (рис. 2), определяли с использованием метода ПЦР-ПДРФ и рестриктазы HhaI. В случае данной мутации возникает дополнительный сайт рестрикции HhaI (сайт рестрикции GCGC). Длина продукта ПЦР — 150 пн. Размеры рестриктов при аллеле дикого типа — 60 и 89 пн, при мутации — 21, 60 и 68 пн (рис. 3). Для ПЦР использовали два праймера GTCCGGCAGCTCTCCACCG и TGCAGTTCGTCACCGACCTGACC. ПЦР проводили при следующем температурном режиме: 95°C, 5 мин, 35 циклов 95°C, 40 с, 67°C, 20 с, 72°C, 20 с; 72°C, 5 мин. Продукт ПЦР обрабатывали рестриктазой HhaI (37°C, 2 ч), продукты рестрикции разделяли в 1,4% агарозном геле (рис. 3).

Результаты и обсуждение

Проведенный нами биоинформационный и филогенетический анализ данных полногеномного секвенирования 205 штаммов ранней древней сублинии генотипа Beijing *M. tuberculosis* показал, что штаммы из Омска и Бурятии с профилем VNTR 14717-15 и близкие ему также группировались в один кластер родственных штаммов и на полногеномном дереве, который мы определили как Beijing 14717-15-кластер (рис. 2).

Следует отметить что этот кластер был монофилетическим, и сравнение его штаммов с соседними ветвями на дендрограмме позволило выявить 58 специфических полиморфизмов SNP. Среди SNP, специфичных для кластера 14717-15, мы выбрали функционально нейтральный SNP (PAM1 = 9867) в геномной позиции 2423040 A > G (*Rv2161c* Val33Ala) и разработали метод его детекции в формате ПЦР-ПДРФ. Фактически эволюционная нейтральность данной замены снижает риск ее селекции в процессе эволюции и адаптации и, таким образом, делает ее наиболее пригодной в качестве диагностического молекулярного маркера. Данная мутация приводит к появлению дополнительного сайта рестрикции HhaI и может быть выявлена с помощью анализа HhaI-ПДРФ амплифицированной ПЦР-области (рис. 3). Метод был оптимизирован с использованием ДНК изолятов с имевшейся информацией по их полным геномам, у которых в данной позиции был или аллель дикого типа, или мутантный аллель. Длина продукта ПЦР составляет 150 п.н. Поскольку в данном участке гена присутствует дополнительный инвариантый сайт HhaI, размеры фрагментов рестрикции составляют 60 и 89 п.н. в случае аллеля дикого типа и 60, 21, 68 п.н. в случае мутации (рис. 3), верхний фрагмент хорошо различим при агарозном гель-электрофорезе даже при небольшом времени электрофореза и малой длине геля, что удобно практически.

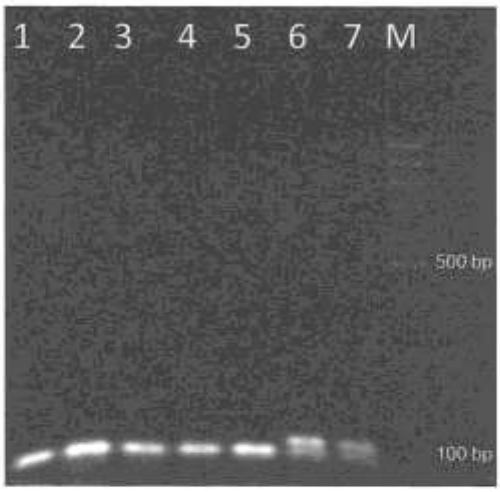


Рисунок 3. HhaI ПЦР-ПДРФ детекция замены в геномной позиции 2423040 A > G (*Rv2161c* Val(s)33Ala)

Figure 3. HhaI PCR-RFLP detection of substitution at genomic position 2423040 A > G (*Rv2161c* Val(s)33Ala)

Примечание. Дорожки 1–5 — Beijing 14717-15-кластер. Дорожки 6–7 — другие генотипы. M — маркер молекулярных весов 100 bp ladder (GE Healthcare).

Note. Lanes 1–5 — Beijing 14717-15-cluster. Lanes 6–7 — other genotypes. M, 100 bp ladder molecular weight marker (GE Healthcare).

Анализ ПЦР-ПДРФ был дополнительно применен к изолятам генотипа Beijing, которые представляли разные сублинии Beijing и имели разные профили VNTR. Все изоляты были ранее генотипированы методом мультилокусного VNTR-анализа, позволяющим точно определить принадлежность штамма к тому или иному VNTR-кластеру, в том числе к кластеру 14717-15. Эти валидационные коллекции включали изоляты из России, Центральной и Восточной Азии. Анализ ПЦР-ПДРФ корректно отнес все изоляты с известным профилем VNTR 14717-15 и родственными профилями к кластеру Beijing 14717-15. Метод имеет 100% чувствительность и 100% специфичность для обнаружения данного кластера.

Далее мы применили метод ПЦР-ПДРФ для скрининга всех имеющихся коллекций ДНК из регионов Европейской и Азиатской частей России и стран Азии. Эти коллекции были из Восточной Сибири и Дальнего Востока (регионы с различной долей штаммов Beijing и Beijing

14717-15 [24]), из Омской области Западной Сибири (регион с небольшим, но постоянным присутствием штаммов Beijing 14717-15 в локальной популяции [14]), из Китая, Вьетнама и Японии (страны с достаточно высокой долей штаммов древних сублиний генотипа Beijing [18, 22, 23]). Результаты по всем проверенным коллекциям приведены в таблице и демонстрируют четкий пик кластера 14717-15 в Бурятии.

Дополнительно мы рассмотрели географическое распространение основных российских кластеров современной сублинии генотипа Beijing (B0/W148 и Central Asian/Russian) и двух основных кластеров древней сублинии, включая Beijing 14717-15-кластер, на основании наших и ранее опубликованных данных [2, 3, 16, 17, 24] (рис. 4). Это сравнение показывает доминирование кластеров современной сублинии генотипа Beijing и относительно более широкое распространение кластера Beijing 1071-32 (древняя сублиния), хотя и в небольшой доле, за исключением Омской области (рис. 4).

Выводы

Клинически значимые штаммы могут возникать среди менее заметных геновариантов, и примером может служить недавно обнаруженный гипервирулентный и высоколетальный кластер Beijing 14717-15. Нами разработан метод его детекции на основе выявления специфической мутации в гене *Rv2161c* с помощью ПЦР с последующей рестрикцией продукта ПЦР и электрофорезом в агарозном геле для дискриминации дикого и мутантного аллелей. Преимуществами предлагаемого способа являются быстрота, простая и однозначная интерпретация результатов, возможность выявления

Таблица. Детекция штаммов Beijing 14717-15 в региональных коллекциях
Table. Detection of strains Beijing 14717-15 in regional collections

Регион РФ или страна Region of Russia, or country	**Всего штаммов*** Total number of strains*	**Генотип Beijing**** Beijing genotype**	**Beijing 14717-15 кластер, количество штаммов и процент от всей коллекции** Beijing 14717-15 cluster, number of strains and percent of all collection
Вологодская область Vologda	82	51	0
Мурманская область Murmansk	67	35	0
Карелия Karelia	67	36	0
Калининградская область Kaliningrad	73	46	0
Омская область Omsk	208	138	4 (2%)
Иркутская область Irkutsk	198	143	4 (2%)
Бурятия Buryatia	265	180	47 (18%)
Забайкальский край Zabaykalskyi krai	62	41	5 (8%)
Монголия Mongolia	143	107	0
Китай China	113	102	0
Казахстан Kazakhstan	97	71	0
Япония Japan	87	87	0

Примечание. *Коллекция из Японии включала только штаммы генотипа Beijing. **Генотип Beijing определяли на основании сполиготипирования или VNTR-типирования. Штаммы кластера Beijing 14717-15 определяли на основании разработанного метода детекции специфического SNP. Большинство штаммов этого кластера имели профили 14717-15 по 24-локусной схеме MIRU-VNTRplus.org.

Note. *Collection from Japan included only Beijing genotype strains. **The Beijing genotype was determined based on spoligotyping or VNTR typing. The strains of the Beijing 14717-15 cluster were detected based on the developed method for detecting a specific SNP. Most strains of this cluster had profiles 14717-15 according MIRU-VNTRplus.org.

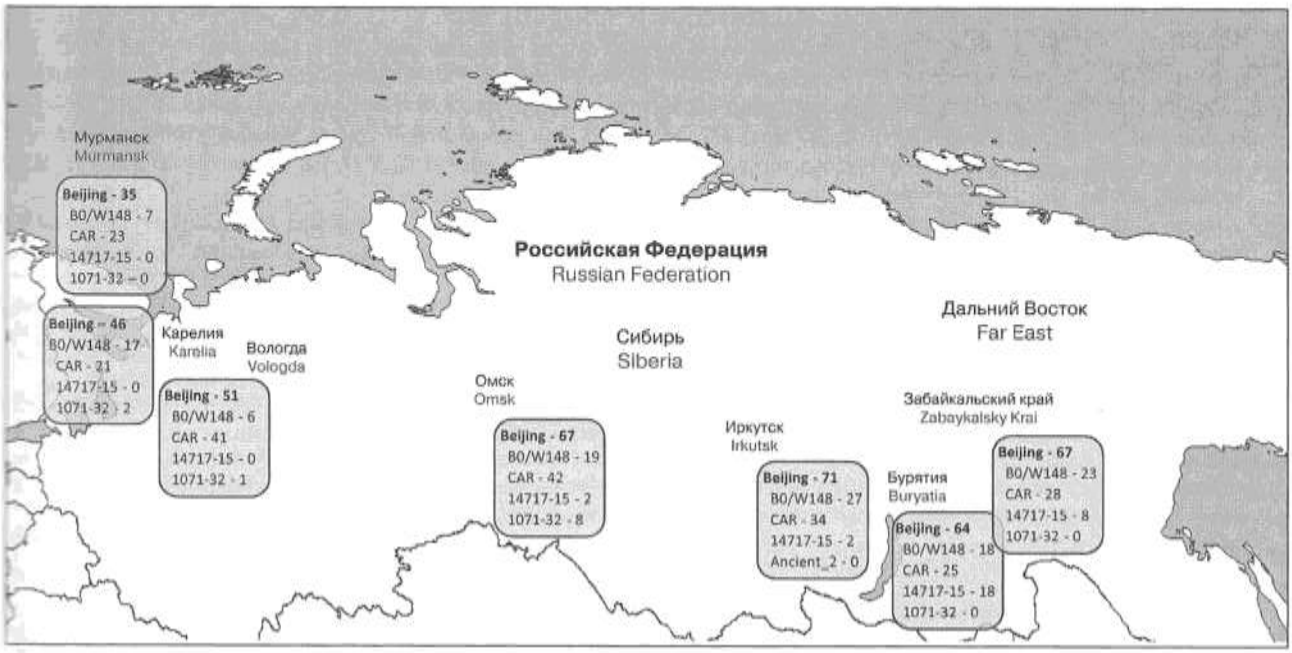


Рисунок 4. Ретроспективный анализ географического распространения штаммов Beijing 14717-15 и других субтипов Beijing в российских регионах

Figure 4. Retrospective analysis of the geographical distribution of Beijing 14717-15 strains and other Beijing subtypes in Russian regions

Примечание. Показан процент в локальной популяции. CAR — Central Asian/Russian.

Note. The percentage in the local population is shown. CAR — Central Asian/Russian.

контаминации и микст-инфекции, пригодность для производительного анализа больших коллекций штаммов *M. tuberculosis*.

Следует отметить, что штаммы Beijing 14717-15 входят в крупную ветвь ранней древней сублинии генотипа Beijing с интактным локусом RD181 (рис. 1), которая весьма гетерогенна и включает штаммы с разнообразными профилями по VNTR. В этом смысле выявленный нами маркер является таковым только для специфического для России кластера Beijing, но не всей ветви RD181-intact.

Российские изоляты кластера 14717-15, включенные в данное исследование, были выделены от больных в азиатской части России. Анализ большего количества штаммов (геномов) из Восточной Азии позволить провести более надежную реконструкцию эволюционной истории этого клинически значимого геноварианта *M. tuberculosis*, в то время как дальнейшие омиксные исследования дадут более информированное понимание его патобиологии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов

Список литературы/References

1. Беспятых Ю.А., Виноградова Т.И., Маничева О.А., Заболотных Н.В., Догонадзе М.З., Витовская М.Л., Гуляев А.С., Журавлев В.Ю., Шитиков Е.А., Ильина Е.Н. Вирулентность Mycobacterium tuberculosis генотипа Beijing в условиях in vivo // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 173–182. [Bespyatykh J.A., Vinogradova T.I., Manicheva O.A., Zabolotnykh N.V., Dogonadze M.Z., Vitovskaya M.L., Guliaev A.S., Zhuravlev V.Yu., Shitikov E.A., Ilina E.N. In vivo virulence of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 173–182. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182*
2. Вязовая А.А., Гаврилова Н.Ю., Герасимова А.А., Бычкова А.О., Авадений И., Аникиева Е.В., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В., Нарвская О.В. Молекулярно-генетический мониторинг популяции Mycobacterium tuberculosis в Мурманской области // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022. Т. 40, № 2. С. 21–27. [Vyazovaya A.A., Gavrilova N.Yu., Gerasimova A.A., Bychkova A.O., Avadenii I., Anikieva E.V., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V. Molecular-genetic monitoring of Mycobacterium tuberculosis population in Murmansk region. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2022, vol. 40, no. 2, pp. 21–27. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/molgen20224002121*
3. Вязовая А.А., Лебедева И.А., Ушакова Н.Б., Павлов В.В., Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В. Молекулярно-генетический анализ популяции Mycobacterium tuberculosis в Вологодской области — регионе

с низкой заболеваемостью туберкулезом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 497–505. [Vyazovaya A.A., Lebedeva I.A., Ushakova N.B., Pavlov V.V., Gerasimova A.A., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V. Molecular and genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis population in the Vologda Region with low tuberculosis incidence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 497–505. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MAG-1545*

4. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Rev. Microbiol., 2018, vol. 16, pp. 202–213. doi: 10.1038/nrmicro.2018.8*
5. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol., 1997, vol. 35, no. 4, pp. 907–914. doi: 10.1128/jcm.35.4.907-914.1997*
6. Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., Bifani P.J., van Soolingen D. Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers. *J. Clin. Microbiol., 2004, vol. 42, no. 9, pp. 4040–4049. doi: 10.1128/JCM.42.9.4040-4049.2004*
7. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol., 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096*
8. Luo T., Comas I., Luo D., Lu B., Wu J., Wei L., Yang C., Liu Q., Gan M., Sun G., Shen X., Liu F., Gagneux S., Mei J., Lan R., Wan K., Gao Q. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2015, vol. 112, no. 26, pp. 8136–8141. doi: 10.1073/pnas.1424063112*
9. Maeda S., Hang N.T., Lien L.T., Thuong P.H., Hung N.V., Hoang N.P., Cuong V.C., Hijikata M., Sakurada S., Keicho N. Mycobacterium tuberculosis strains spreading in Hanoi, Vietnam: Beijing sublineages, genotypes, drug susceptibility patterns, and host factors. *Tuberculosis (Edinb.), 2014, vol. 94, no. 6, pp. 649–656. doi: 10.1016/j.tube.2014.09.005*
10. Mokrousov I., Ly H.M., Otten T., Lan N.N., Vyshnevskyi B., Hoffner S., Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res., 2005, vol. 15, no. 10, pp. 1357–1364. doi: 10.1101/gr.3840605*
11. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskyi B. Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia. *Res. Microbiol., 2002, vol. 153, no. 10, pp. 629–637. doi: 10.1016/s0923-2508(02)01374-8*
12. Mokrousov I., Pasechnik O., Vyazovaya A., Yarusova I., Gerasimova A., Blokh A., Zhuravlev V. Impact of pathobiological diversity of Mycobacterium tuberculosis on clinical features and lethal outcome of tuberculosis. *BMC Microbiol., 2022, vol. 22: 50. doi: 10.1186/s12866-022-02461-w*
13. Mokrousov I., Sinkov V., Vyazovaya A., Pasechnik O., Solovieva N., Khromova P., Zhuravlev V., Ogarkov O. Genomic signatures of drug resistance in highly resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the early ancient sublineage of Beijing genotype in Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents, 2020, vol. 56, no. 2: 106036. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106036*
14. Mokrousov I., Vyazovaya A., Pasechnik O., Gerasimova A., Dymova M., Chernyaeva E., Tatarintseva M., Stasenko V. Early ancient sublineages of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: unexpected clues from phylogenomics of the pathogen and human history. *Clin. Microbiol. Infect., 2019, vol. 25, no. 8, pp. 1039.e1–1039.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.024*
15. Mokrousov I., Vyazovaya A., Sinkov V., Gerasimova A., Ioannidis P., Jiao W., Khromova P., Papaventsis D., Pasechnik O., Perdigão J., Rastogi N., Shen A., Skiba Y., Solovieva N., Suffys P., Tafaj S., Umpeleva T., Vakhrusheva D., Yarusova I., Zhdanova S., Zhuravlev V., Ogarkov O. Practical approach to detection and surveillance of emerging highly resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing 1071-32-cluster. *Sci. Rep., 2021, vol. 11: 21392. doi: 10.1038/s41598-021-00890-7*
16. Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N., Sunchalina T., Markelov Y., Chernyaeva E., Melnikova N., Dogonadze M., Starkova D., Vasilieva N., Gerasimova A., Kononenko Y., Zhuravlev V., Narvskaya O. Trends in molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Republic of Karelia, Russian Federation. *BMC Microbiol., 2015, vol. 15: 279. doi: 10.1186/s12866-015-0613-3*
17. Pasechnik O., Vyazovaya A., Vitriv S., Tatarintseva M., Blokh A., Stasenko V., Mokrousov I. Major genotype families and epidemic clones of Mycobacterium tuberculosis in Omsk region, Western Siberia, Russia, marked by a high burden of tuberculosis-HIV coinfection. *Tuberculosis (Edinb.), 2018, vol. 108, pp. 163–168. doi: 10.1016/j.tube.2017.12.003*
18. Shamputa I.C., Lee J., Allix-Béguec C., Cho E.J., Lee J., Rajan V., Lee E.G., Min J.H., Carroll M.W., Goldfeder L.C., Kim J.H., Kang H.S., Hwang S., Eum S.Y., Park S.K., Lee H., Supply P., Cho S.-N., Via L.E., Barry C.E. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. *J. Clin. Microbiol., 2010, vol. 48, pp. 3873–3894. doi: 10.1128/jcm.02167-09*
19. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsch-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol., 2006, vol. 44, pp. 4498–4510. doi: 10.1128/JCM.01392-06*
20. Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M. Strain identification on Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol., 1993, vol. 31, pp. 406–409. doi: 10.1128/jcm.31.2.406-409.1993*
21. Vinogradova T., Dogonadze M., Zabolotnykh N., Badleeva M., Yarusova I., Vyazovaya A., Gerasimova A., Zhdanova S., Vitovskaya M., Solovieva N., Pasechnik O., Ogarkov O., Mokrousov I. Extremely lethal and hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain cluster emerging in Far East, Russia. *Emerg. Microbes Infect., 2021, vol. 10, no. 1, pp. 1691–1701. doi: 10.1080/22221751.2021.1967704*
22. Wada T., Iwamoto T., Maeda S., Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol. Lett., 2009, vol. 291, no. 1, pp. 35–43. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01431.x*

23. Yin Q.Q., Liu H.C., Jiao W.W., Li Q.J., Han R., Tian J.L., Liu Z.G., Zhao X.Q., Li Y.J., Wan K.L., Shen A.D., Mokrousov I. Evolutionary history and ongoing transmission of phylogenetic sublineages of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in China. *Sci. Rep., 2016, vol. 6: 34353. doi: 10.1038/srep34353*
24. Zhdanova S., Mokrousov I., Orlova E., Sinkov V., Ogarkov O. Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia. *Transbound. Emerg. Dis., 2022, vol. 69, no. 5, pp. e1800-e1814. doi: 10.1111/tbed.14515*

Авторы:
Мокроусов И.В., д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Вязовая А.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Бадлеева М.В., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ, Россия;
Герасимова А.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Белопольская О.Б., к.б.н., ведущий специалист РЦ «Центр Биобанк» — Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;
Машарский А.Э., к.б.н., ведущий специалист РЦ «Центр Биобанк» — Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;
Костюкова И.В., врач-бактериолог, зав. лабораторией БУЗОО Клинический противотуберкулезный диспансер, г. Омск, Россия;
Жданова С.Н., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Мударисова Р.С., лаборант-исследователь лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Авадэний И., младший научный сотрудник, врач-бактериолог бактериологической лаборатории Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;
Соловьева Н.С., к.м.н., зав. бактериологической лабораторией Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;
Найзабаева Д.А., научный сотрудник лаборатории экспертизы и диагностики Филиала Национального центра биотехнологии в г. Алматы, г. Алматы, Казахстан; аспирант кафедры биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан;
Скиба Ю.А., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии, директор Алматинского филиала Национального центра биотехнологии, г. Алматы, Казахстан;
Журавлев В.Ю., к.м.н., ведущий научный сотрудник, координатор направления «Лабораторная диагностика» Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;
Пасечник О.А., д.м.н., зав. кафедрой общественного здоровья и здравоохранения Омского государственнного медицинского университета, г. Омск, Россия;
Огарков О.Б., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:
Mokrousov I.V., DSc (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Vyazovaya A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Badleeva M.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Buryat State University, Ulan-Ude, Russian Federation;
Gerasimova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Belopolskaya O.B., PhD (Biology), Leading Expert, Resource Center "Bio-bank Center", Research Park of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;
Masharsky A.E., PhD (Biology), Leading Expert, Resource Center "Bio-bank Center", Research Park of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;
Kostyukova I.V., Bacteriologist, Head of the Bacteriology Laboratory, Clinical Antituberculosis Dispensary Omsk, Russian Federation;
Zhdanova S.N., DSc (Medicine), Leading Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Mudarisova R.S., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Avadenii I., Junior Researcher, Bacteriologist, Bacteriology Laboratory, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Solovieva N.S., PhD (Medicine), Head of the Bacteriology Laboratory, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Naizabayeva D.A., Researcher, Laboratory of Expertise and Diagnostics, Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Almaty, Kazakhstan; PhD Student, Department of Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan;
Skiba Yu.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology, Director of Almaty Branch of National Center for Biotechnology, Almaty, Kazakhstan;
Zhuravlev V.Yu., PhD (Medicine), Leading Researcher, Coordinator of Laboratory Diagnostics Department, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Pasechnik O.A., DSc (Medicine), Head, Department of Public Health, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Ogarkov O.B., DSc (Medicine), Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.11.2022
Отправлена на доработку 24.11.2022
Принята к печати 03.12.2022

Received 24.11.2022
Revision received 24.11.2022
Accepted 03.12.2022

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 100–106

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 100–106

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РИККЕТСИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ И ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

С.В. Штрек[1,2], Н.В. Рудаков[1,2], С.Н. Шпынов[1,2], А.В. Санников[1], И.Е. Самойленко[1], Л.Д. Щучинова[3], О.Е. Троценко[4], А.Г. Драгомерецкая[4], Е.В. Матущенко[1,2]

[1] ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия
[2] ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Омск, Россия
[3] Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Алтай, г. Горно-Алтайск, Россия
[4] Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия

Резюме. Цель — верификация возбудителя сибирского клещевого тифа (СКТ) при микст-инфицированности иксодовых клещей на территории Республики Алтай и Хабаровского края с применением комплексного молекулярно-биологического подхода. *Материалы и методы.* Материалом для исследования служили 304 имаго иксодовых клещей шести видов. Сбор клещей проводился на территории Республики Алтай и Хабаровского края в 2014–2022 гг. ДНК риккетсий идентифицировали методом двухраундовой ПЦР с использованием родо- и видоспецифических праймеров генов *gltA* и *ompA* с последующим секвенированием и с помощью ПЦР с использованием наборов реагентов «РеалБест ДНК R. sibirica/R. heilongjiangensis» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). *Результаты.* Частота выявления ДНК риккетсий в иксодовых клещах в Республике Алтай составила 82,6% (ДИ: 69,1–96,1), в Хабаровском крае — 53,1% (ДИ: 44,9–61,3). Видовой состав риккетсий в различных видах иксодовых клещей на этих территориях, эндемичных по сибирскому клещевому тифу, характеризуется наличием микст-инфицированности. ДНК *Rickettsia sibirica* и *R. raoultii* удалось обнаружить в клещах *Dermacentor nuttalli*, *Haemaphysalis concinna*, *D. silvarum*. В клещах *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi* и в гибридах *I. pavlovskyi/persulcatus* выявлена ДНК только Candidatus *R. tarasevichiae*. ДНК *R. heilongjiangensis* обнаружена в клещах *H. concinna* в Хабаровском крае. В клещах *D. nuttalli* и *H. concinna* из Республики Алтай выявлена только ДНК Candidatus *R. tarasevichiae*. ДНК «классического» патогенного вида — *R. sibirica* выявлена в клещах *D. nuttalli* и *H. concinna* в Республике Алтай, клещах *D. silvarum*, *H. concinna* и *H. japonica douglasi* — в Хабаровском крае. Кроме того, в Хабаровском крае в клещах *H. concinna* обнаружена ДНК — *R. heilongjiangensis*, в клещах *H. japonica douglasi* выявлен фрагмент ДНК, общий для *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* и *R. conorii*, что требует дальнейшего изучения. ДНК Candidatus *R. tarasevichiae* детектирована в клещах рода *Ixodes* (*I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их гибридах), в Республике Алтай — в клещах *D. nuttalli* и *H. concinna*. ДНК *R. raoultii* выявлена в клещах рода *Dermacentor* — *D. nuttalli* — в Республике Алтай и *D. silvarum* в Хабаровском крае. *Выводы.* При молекулярно-биологическом мониторинге риккетсий на эндемичных территориях выявление *R. raoultii* «маскирует» присутствие этиологического агента СКТ — *R. sibirica*. Этот феномен позволяет объяснить высокий уровень заболеваемости СКТ на изучаемых территориях при редкой выявляемости ДНК *R. sibirica* при молекулярно-биологическом скрининге в иксодовых клещах.

Ключевые слова: *Rickettsia sibirica, Rickettsia heilongjiangensis, Candidatus Rickettsia tarasevichiae, Rickettsia raoultii, Республика Алтай, Хабаровский край.*

Адрес для переписки:
Штрек Сергей Владимирович
644080, Россия, г. Омск, пр. Мира, 7, ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (3812) 65-14-77. E-mail: studi1990@mail.ru

Contacts:
Sergey V. Shtrek
644080, Russian Federation, Omsk, Mira pr., 7,
Omsk Research Institute of Natural Focal Infections.
Phone: +7 (3812) 65-14-77. E-mail: studi1990@mail.ru

Для цитирования:
Штрек С.В., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Санников А.В., Самойленко И.Е., Щучинова Л.Д., Троценко О.Е., Драгомерецкая А.Г., Матущенко Е.В. Генотипирование риккетсий, циркулирующих на территориях Республики Алтай и Хабаровского края // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 100–106. doi: 10.15789/2220-7619-GOR-2014

Citation:
Shtrek S.V., Rudakov N.V., Shpynov S.N., Sannikov A.V., Samoylenko I.E., Shchuchinova L.D., Trotsenko O.E., Dragomeretskaya A.G., Matushchenko E.V. Genotyping of rickettsias circulating in the territories of the Altai Republic and Khabarovsk Krai // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 100–106. doi: 10.15789/2220-7619-GOR-2014

© Штрек С.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GOR-2014

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

GENOTYPING OF RICKETTSIAS CIRCULATING IN THE TERRITORIES OF THE ALTAI REPUBLIC AND KHABAROVSK KRAI

Shtrek S.V.[a,b], Rudakov N.V.[a,b], Shpynov S.N.[a,b], Sannikov A.V.[a], Samoylenko I.E.[a], Shchuchinova L.D.[c], Trotsenko O.E.[d], Dragomeretskaya A.G.[d], Matushchenko E.V.[a,b]

[a] *Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections, Omsk, Russian Federation*
[b] *Omsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Omsk, Russian Federation*
[c] *Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Altai Republic, Gorno-Altaisk, Russian Federation*
[d] *Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Khabarovsk, Russian Federation*

Abstract. The aim of the study was to verificate of the causative agent of Siberian tick-borne typhus (STT) upon ixodic tick mixed infection on the territory of the Altai Republic and Khabarovsk Krai using an integrated molecular biological approach. *Materials and methods.* The material for the study was presented as 304 imago of ixodic mites of six species. The ticks were collected on the territory of the Altai Republic and the Khabarovsk Krai in the years 2014–2022. Rickettsia DNA was identified by two-round PCR using genus- and species-specific primers for *gltA* and *ompA* genes, followed by sequencing and using PCR reagent kits "RealBest DNA R. sibirica/R. heilongjiangensis" (Vector-Best, Novosibirsk). *Results.* The detection of rickettsia in ticks in the Altai Republic was 82.6% (CI: 69.1–96.1), in the Khabarovsk Krai — 53.1% (CI: 44.9–61.3). The species composition of rickettsias in various species of ixodic mites in these territories, endemic to Siberian tick typhus, is characterized by the presence of mixed forms. *Rickettsia sibirica* and *R. raoultii* were found in ticks *Dermacentor nuttalli*, *Haemaphysalis concinna*, *D. silvarum*. Only Candidatus *R. tarasevichiae* were detected in *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovsky* mites and *I. pavlovsky/persulcatus* hybrids. The DNA of *R. heilongjiangensis* was found in H. mites. concinna in the Khabarovsk Krai. The DNA of Candidatus *R. tarasevichiae* is also present in the ticks of *D. nuttalli* and *H. concinna* from the Altai Republic. The DNA of the "classic" pathogenic species, *R. sibirica*, was detected in ticks *D. nuttalli* and *H. concinna* in the Altai Republic, ticks *D. silvarum*, *H. concinna* and *H. japonica douglasi* in the Khabarovsk Krai. In addition, in the Khabarovsk Krai, the DNA of *R. heilongjiangensis* was detected in *H. concinna* ticks, and a DNA fragment common to *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* and *R. conorii* was detected in *H. japonica douglasi* ticks, which requires further study. Candidatus *R. tarasevichiae* is common in *Ixodes mites* (*I. persulcatus*, *I. pavlovsky* and their hybrids), in the Altai Republic in *D. nuttalli* and *H. concinna*. R mites. raoultii was detected in ticks of the genus *Dermacentor* — *D. nuttalli* in the Altai Republic and *D. silvarum* in the Khabarovsk Krai. *Conclusions.* During molecular biological monitoring of rickettsias in endemic territories, the detection of *R. raoultii* "masks" the presence of the etiological agent of STT — *R. sibirica*. This phenomenon makes it possible to explain the high incidence of STT in the studied territories, with the rare detectability of *R. sibirica* DNA during molecular biological screening in ixodic mites.

Key words: *Rickettsia sibirica, Rickettsia heilongjiangensis, Candidatus Rickettsia tarasevichiae, Rickettsia raoultii, Altai Republic, Khabarovsk Krai.*

Введение

Впервые описанные случаи ранее неизвестного риккетсиального заболевания, возникающего на эндемичных территориях Азиатской части России после присасывания клещей и протекающего с высокой температурой, первичным аффектом, розеолезно-петехиальной сыпью, изменениями со стороны центральной нервной системы, выявлены практически одновременно (1934–1935 гг.) в Приморье — «клещевая лихорадка Приморья», в Хабаровском крае — «дальневосточная сыпная клещевая лихорадка», в Красноярском крае — «клещевая сыпная лихорадка» [6].

Планомерное изучение новой инфекции в 1937–1938 гг. в Красноярском крае под руководством М.К. Кронтовской позволило выделить клещевой сыпной тиф (в настоящее время регистрируют как сибирский клещевой тиф — СКТ) в самостоятельную нозологическую форму. Установлена риккетсиозная этиология заболевания (по современной номенклатуре *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*), классический переносчик — клещи *Dermacentor nuttalli Ol.*, основные эпидемиологические закономерности. В 1940 г. экспедицией, возглавляемой М.К. Кронтовской, в Хабаровском крае выделены штаммы риккетсий от больных, клещей *Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor silvarum* [4].

В результате многолетних исследований выявлен широкий нозоареал СКТ с наибольшим эпидемическим потенциалом очагов на юге Сибири и Дальнего Востока России. Применительно к эндемичным территориям число эпидемически значимых переносчиков в очагах колеблется от одного-двух (*D. nuttalli* — горные степи Алтая, лесостепи Минусинской и Канской котловин, Тувы, Предбайкалья и Забайкалья; *D. marginatus* и в меньшей степени *D. reticulatus* — равнинные степные и лесостепные ландшафты Западно-Сибирской низменности, *D. silvarum* и *H. concinna* — лесостепи Салаира, Кузнецкой котловины, юга Дальнего

Востока) до четырех видов (*D. marginatus*, *H. concinna*, *D. silvarum*, *D. reticulatus* — северная лесостепь Алтайского края, Северный Алтай) [7]. В Республике Алтай находятся наиболее эпидемически активные очаги СКТ и отмечается наиболее высокий уровень заболеваемости в России: среднемноголетний показатель заболеваемости достигает 72 на 100 тыс. населения, что примерно в 50 раз превышает аналогичный показатель по РФ [9].

Уже в первый период изучения клещевых риккетсиозов (КР) возникли вопросы об отличиях циркулирующих на очаговых территориях штаммов риккетсий. Удалось установить этиологию случаев КР на юге Хабаровского края как вызванных *R. heilongjiangensis* [2, 17]. Эта риккетсия выявлена в «пятнах» *H. concinna* в пределах нозоареала КР в Приморском, Хабаровском, Алтайском и Красноярском краях, в последнем — также в клещах *D. nuttalli* [18, 19]. В Хабаровском крае в клещах *Ixodes persulcatus* молекулярными методами выявляли Candidatus *R. tarasevichiae, R. helvetica* и *R. heilongjiangensis* [1, 3]

По современным представлениям, основанным на многолетнем изучении штаммов риккетсий из коллекции Омского НИИ природно-очаговых инфекций, на Дальнем Востоке России, наряду с классическим возбудителем СКТ *R. sibirica* subsp. *sibirica,* циркулируют *R. heilongjiangensis* и геновариант *R. sibirica* subsp. *BJ-90* [5].

Целью данного исследования является верификация возбудителя СКТ при микст-инфицированности риккетсиями иксодовых клещей на территории Республики Алтай и Хабаровского края с применением комплексного молекулярно-биологического подхода.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 304 имаго клещей шести видов *(D. nuttalli, D. silvarum, H. concinna, H. japonica douglasi, I. persulcatus, I. pavlovskyi, I. pavlovskyi/persulcatus).* Сбор клещей проводился на флаг на территории Республики Алтай и Хабаровского края в 2014–2022 гг. (табл. 1). Идентификацию клещей осуществляли по морфологическим признакам по Филипповой [10]. Из клещей, полученных в 2014, 2018 и 2019 гг. готовили гомогенизированную суспензию, у клещей, собранных в 2022 г., для исследования забирали гемолимфу с последующим выделением ДНК.

Выделение нуклеиновых кислот проводили наборами «АмплиПрайм РИБО-преп» компании «ИнтерЛабСервис» (Москва, Россия) и набором реагентов «РеалБест экстракция 100» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). ДНК риккетсий выявляли (табл. 2) методом двухраундовой ПЦР с использованием родо- и видоспецифических праймеров генов *gltA* и *ompA* [15] с последующим секвенированием и в ПЦР-РВ с помощью наборов реагентов «РеалБест ДНК R. sibirica/R. heilongjiangensis» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

95% доверительный интервал (ДИ) уровня выявляемости риккетсий в клещах был рассчитан в программе MS Excel.

Результаты

В результате ПЦР-анализа установлена суммарная выявляемость ДНК риккетсий в 82,6% (ДИ: 69,1–96,1) иксодовых клещей на территории Республики Алтай. ДНК риккетсий была выявлена в 84,4% (ДИ: 69,0–99,8) исследованных клещей *D. nuttalli.* Самым распространенным видом риккетсий в клещах этого вида оказалась *R. raoultii*, обнаруженная в 47,4% (ДИ: 38,8–56,0) иксодид. В *D. nuttalli* также в высоком количестве выявлена ДНК *R. sibirica* в 35,3% (ДИ: 28,9–41,7) и Ca. *R. tarasevichiae* в 1,7% (1,4–2,0). В 21,6% (ДИ: 17,7–25,5) этого вида клещей установлена микст-инфицированность *R. sibirica* и *R. raoultii.* ДНК риккетсий была выявлена в 73,9% (ДИ: 43,7–100) клещей *H. concinna.* Среди выявленных риккетсий преобладающим видом была Ca. *R. tarasevichiae* (39,1%; ДИ: 23,2–55,0). Реже была выявлена ДНК *R. sibirica* и *R. raoultii.* В одной пробе выявлены одновременно Ca. *R. tarasevichiae* и *R. raoultii.* В клещах *I. persulcatus* идентифицировали только Ca. *R. tarasevichiae.*

При исследовании клещей, собранных на флаг в 2018 г. на территории Хабаровского края, уровень выявляемости ДНК риккетсий составил 53,1% (ДИ: 44,9–61,3). ДНК риккетсий была выявлена в 22,2% (ДИ: 11,9–32,5) исследованных клещей *H. concinna.* Чаще всего в клещах этого вида выявлялась ДНК *R. sibirica*, в одном экземпляре генотипировали *R. heilongjiangensis.* ДНК риккетсий была обнаружена в 13,0% (ДИ: 7,7–18,3) исследованных клещей *H. japonica douglasi.* Чаще выявлялась ДНК *R. sibirica*, фрагмент последовательности гена *gltA* у одного из образцов был идентичен последовательности *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae/R. conorii* (GenBank: KT345979.1). В 60,0% (ДИ: 47,6–72,4) исследованных клещей *I. pavlovskyi* была выявлена ДНК риккетсий, идентифицированная как Ca. *R. tarasevichiae.* Схожая картина наблюдалась в клещах *I. persulcatus* и гибридах *I. pavlovskyi/persulcatus*, где так же выявляли ДНК Ca. *R. tarasevichiae*, уровень выявляемости составил 90,9% (ДИ: 37,2–100), и 68,8% (ДИ: 35,1–100) соответственно. В клещах *D. silvarum* выявлена ДНК *R. sibirica*, в том числе одновременно с *R. raoultii.*

Обсуждение

В данной работе установлено, что у основных переносчиков возбудителя СКТ *(D. nuttalli, H. concinna, D. silvarum)* [7] с применением комплексного молекулярно-биологического подхода ДНК *R. sibirica* выявляется значительно чаще при микст-инфицированности с *R. raoultii*, чем индивидуально. В единичных случаях может встречаться микст-инфицированность Ca. *R. tarasevichiae* и *R. raoultii* клещей вида *H. concinna*, при этом первый вид риккетсий является преобладающим. В одном экземпляре клеща *H. japonica douglasi* из Хабаровского края получен сиквенс фрагмента (512 п.о.) гена цитратсинтазы *(gltA)* имеющий 100% гомологии по 501 нуклеотиду с *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* и с *R. conorii*, что требует дальнейшего изучения.

Установлена суммарная выявляемость риккетсий в 82,6% (ДИ: 69,1–96,1) клещей на территории Республики Алтай, что подтверждает полученные нами ранее данные при исследовании иксодовых клещей на наличие антигенов риккетсий группы КПЛ с помощью разработанной ИФА тест-системы [11].

Удалось доказать ранее высказанное предположение о недостаточной информативности применения ПЦР с «классическими» *(gltA, OmpA)* праймерами в очагах СКТ [20], не позволяющее выявлять в индивидуальных пробах иксодовых клещей *R. sibirica* при более массовом присутствии копий ДНК *R. raoultii* [8].

При очевидных преимуществах метода секвенирования по Сэнгеру, на этапе ПЦР с применением родоспецифичных праймеров осуществляется амплификация варианта гена только одного вида риккетсий, при этом ДНК остальных видов не выявляется. Комплексный подход, основанный на применении различных модификаций ПЦР с разными видами праймеров, включая родо- и видоспецифичные, с последующим секвенированием позволило получить более объективную информацию при скриннинге ДНК различных видов риккетсий в индивидуальных пробах иксодовых клещей. В результате применения этого подхода ДНК «классического» патогенного вида — *R. sibirica* выявлена в клещах *D. nuttalli* и *H. concinna* в Республике Алтай, клещах *D. silvarum*, *H. concinna* и *H. japonica douglasi* в Хабаровском крае. В то же время при генотипировании риккетсий в пробах клинического материала от пациентов в очагах СКТ в Республике Алтай, Алтайском и Хабаровском краях удалось выявить ДНК *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis* [12, 13, 16]. При этом на территории Новосибирской области в пробах клинического материала от пациентов с подозрением на «клещевые» инфекции ДНК *R. sibirica* выявлялась в 2,3 раза чаще, чем *R. raoultii* [14].

Выводы

При молекулярно-биологическом мониторинге риккетсий на эндемичных территориях выявление *R. raoultii* «маскирует» присутствие этиоло-

Таблица 1. Характеристика исследованных клещей
Table 1. Characteristics of the studied ticks

Вид клещей Species of ticks	**Год сбора** Year of collection	**Место сбора** Gathering place	**Количество** Quantity
D. nuttalli	2014	**Кош-Агачский р-н Р.А.***/Kosh-Agachsky district A.R.*	65
	2019	**Усть-Коксинский р-н Р.А.**/Ust-Koksinsky district A.R.	1
	2022	**Онгудайский р-н Р.А.**/Ongudai district A.R.	50
H. concinna	2019	**Горно-Алтайский р-н Р.А.**/Gorno-Altaisky district A.R.	3
		Майминский р-н Р.А./Maiminsky district A.R.	4
		Чойский р-н Р.А./Choysky district A.R.	16
	2018	**Хабаровский р-н Х.К.****/Khabarovsk district Kh.K.**	18
I. persulcatus	2019	**Чойский р-н Р.А.**/Choysky district A.R.	5
	2018	**Хабаровский р-н Х.К.**/Khabarovsk district Kh.K.	9
		Р-н имени Лазо Х.К./Lazo District Kh.K.	2
H. japonica douglasi	2018	**Хабаровский р-н Х.К.**/Khabarovsk district Kh.K.	23
I. pavlovskyi	2018	**Хабаровский р-н Х.К.**/Khabarovsk district Kh.K.	63
		Р-н имени Лазо Х.К./Lazo District Kh.K.	27
I. pavlovskyi/persulcatus	2018	**Хабаровский р-н Х.К.**/Khabarovsk district Kh.K.	12
		Р-н им. Лазо Х.К./Lazo District Kh.K.	4
D. silvarum	2018	**Р-н им. Лазо Х.К.**/Lazo District Kh.K.	2

Примечание. *Республика Алтай; **Хабаровский Край.
Note. *Altai Republic; **Khabarovsk Krai.

Таблица 2. Результаты исследования иксодовых клещей, собранных на территориях Республики Алтай и Хабаровского края на наличие ДНК риккетсий
Table 2. The results of the study of ixodic ticks collected in the territories of the Altai Republic and the Khabarovsk Krai for the presence of Rickettsia DNA

Вид клеща Species of tick	**Республика Алтай**/Altai Republic			**Хабаровский край**/Khabarovsk Krai		
	Вид возбудителя Species of pathogen	**Количество** Quantity	**% (ДИ**/CI)	**Вид возбудителя** Species of pathogen	**Количество** Quantity	**% (ДИ**/CI)
D. nuttalli	***R. sibirica****	16	13,8% (11,7–15,9)	**Данный вид клещей отсутствует на указанной территории** This species of ticks is not present in the specified territory		
	Candidatus *R. tarasevichiae* **	2	1,7% (1,5–2,0)			
	R. raoultii*	55	47.4% (40,1–54,8)			
	R. sibirica**/*R. raoultii****	25	21,6% (18,2–24,9)			
H. concinna	***R. sibirica*****	1	4,4% (2,8–5,9)	***R. sibirica*****	3	16,7% (10,1–23,2)
	R. raoultii**	5	21,7% (14,2–29,3)	***R. heilongjiangensis*****	1	5,6% (3,4–7,7)
	Candidatus *R. tarasevichiae* **	8	34,8% (22,7–46,9)			
	R. sibirica**/*R. raoultii*****	2	8,7% (5,7–11,7)	**Риккетсия не идентифицирована*** Rickettsia has not been identified	1	5,6% (3,4–7,7)
	R. raoultii**/*R. tarasevichiae***	1	4,4% (2,8–5,9)			
I. persulcatus	**Candidatus *R. tarasevichiae*** **	4	80,0% (20,3–100)	**Candidatus *R. tarasevichiae*** **	10	90,9% (45,2–100)
H. japonica douglasi	**Данный вид клещей отсутствует на указанной территории** This species of ticks is not present in the specified territory			***R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*/*R. conorii*****	1	4,4% (2,8–5,9)
				R. sibirica**	2	8,7% (5,7–11,7)
I. pavlovskyi	**Данный вид клещей в этой работе не исследовался** This species of mites has not been studied in this work			**Candidatus *R. tarasevichiae*** **	54	60,0% (49,5–70,6)
I. pavlovskyi/ persulcatus	**Данный вид клещей в этой работе не исследовался** This species of mites has not been studied in this work			**Candidatus *R. tarasevichiae*** **	11	68,8% (40,1–97,5)
D. silvarum	**Данный вид клещей в этой работе не исследовался** This species of mites has not been studied in this work			***R. sibirica*****	1	50,0% (0–100)
				R. sibirica**/*R. raoultii*****	1	50,0% (0–100)

Примечание. * — ПЦР с видоспецифическими праймерами к гену *ompA*; ** — ПЦР+секвенирование фрагмента гена *gltA*; *** — ПЦР+секвенирование фрагмента гена *ompA*; **** — Наборов реагентов для ПЦР в режиме реального времени «РеалБест ДНК *R. sibirica*/*R. heilongjiangensis*».

Note. * — PCR with species-specific primers for the OmpA gene; ** — PCR+sequencing of *gltA* gene fragment; *** — PCR+sequencing of OmpA gene fragment; **** — Sets of reagents for real-time PCR "RealBest DNA *R. sibirica*/*R. heilongjiangensis*".

гического агента СКТ — *R. sibirica*. Этот феномен позволяет объяснить высокий уровень заболеваемости СКТ на изучаемых территориях при редкой выявляемости ДНК *R. sibirica* при молекулярно-биологическом скрининге в иксодовых клещах.

Необходимо внедрение комплексного молекулярно-биологического подхода для совершенствования эпидемиологического надзора за природными очагами СКТ за счет молекулярно-биологического скрининга ДНК риккетсий в иксодовых клещах и изучения значимости различных видов риккетсий в структуре региональной инфекционной патологии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Бондаренко Е.И., Мокрецова Е.В., Здановская Н.И., Высочина Н.П., Пуховская Н.М., Тимофеев Д.И., Иванов М.К. Выявление возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах и крови пациентов на Дальнем Востоке с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени. Поликлиника. 2014. № 4–1. С. 44–48. [Bondarenko E.I., Mokrecova E.V., Zdanovskaya N.I., Vysochina N.P., Puhovskaya N.M., Timofeev D.I., Ivanov M.K. Detection of tick-borne rickettsiosis pathogens in ticks and blood of patients in the Far East using real-time PCR analysis. *Poliklinika = Polyclinic, 2014, no. 4–1, pp. 44–48. (In Russ.)*]
2. Григорьева Я.Е., Карань Л.С., Мокрецова Е.В., Щучинова Л.Д., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Сравнительный анализ ПЦР- и ИФА-методов в лабораторной диагностике риккетсиозов группы КПЛ на примере трехлетних исследований в Республике Алтай и Хабаровском крае // Молекулярная диагностика. 2017. Т. 2. С. 192–194. [Grigor'eva Ya.E., Karan' L.S., Mokrecova E.V., Shchuchinova L.D., Fedorova M.V., Zhurenkova O.B., Shipulin G.A., Maleev V.V. Comparative analysis of PCR and ELISA methods in laboratory diagnostics of rickettsioses of the KPL group on the example of three-year studies in the Altai Republic and Khabarovsk Krai. *Molekulyarnaya diagnostika = Molecular Diagnostics, 2017, vol. 2, pp. 192–194. (In Russ.)*]
3. Иголкина Я.П., Бондаренко Е.И., Рар В.А., Епихина Т.И., Панов В.В., Высочина Н.П., Пуховская Н.М., Малькова М.Г., Василенко А.Г., Якименко В.В., Танцев А.К., Иванов М.К., Тикунова Н.В. Молекулярно-генетический анализ риккетсий, переносимых клещами Ixodes persulcatus schulze на территории юга Западной Сибири и Дальнего Востока // Национальные приоритеты России. 2014. № 3 (13). С. 100–103. [Igolkina Y.P., Bondarenko E.I., Rar V.A., Epikhina T.I., Panov V.V., Vysochina N.P., Pukhovskaya N.M., Malkova M.G., Vasilenko A.G., Yakimenko V.V., Tantsev A.K., Ivanov M.K., Tikunova N.V. Molecular genetic analysis of Rickettsia spp. Transmitted by Ixodes persulcatus ticks in the south-Western Siberia and the Far East. *Nacional'nye prioritety Rossii = Russia's National Priorities, 2014, no. 3 (13), pp. 100–103. (In Russ.)*]
4. Рудаков Н.В. К 75-летию открытия Rickettsia sibirica – возбудителя клещевого сыпного тифа: история изучения и современные представления // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014. № 1. С. 4–5. [Rudakov N.V. 75th anniversary of the Rickettsia sibirica discovery: history of study and modern ideasi. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention, 2014, no. 1, pp. 4–5. (In Russ.)*]
5. Рудаков Н.В. Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей. Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2016. 424 с. [Rudakov N.V. Rickettsia and rickettsioses: a guidebook for doctors. *Omsk: Omsk Science Bulletin, 2016. 424 p. (In Russ.)*]
6. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. Омск: Изд-во Омской государственной медицинской академии, 2001. 120 с. [Rudakov N.V., Obert A.S. Tick-borne rickettsiosis. *Omsk: Omsk State Medical Academy Publishing, 2001. 120 p. (In Russ.)*]
7. Рудаков Н.В., Рудакова С.А. Клещевые трансмиссивные инфекции Сибири. Практическое руководство. Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник», 2019. 146 с. [Rudakov N.V., Rudakova S.A. Tick-borne vector-borne infections of Siberia. Practical guide. *Omsk: LLC Omskiy nauchnyy vestnik Publishing Center, 2019. 146 p. (In Russ.)*]
8. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. № 1. С. 50–52. [Rudakov N.V., Samoilenko I.E, Reshetnikova T.A. The problems of laboratory diagnostic of rickett siosis of group spott ed tick-bite fever in Russia. *Clinicheskay laboratornay diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2015, no. 1, pp. 50–52. (In Russ.)*]
9. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Транквилевский Д.В., Пакскина Н.Д., Савельев Д.А., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Кумпан Л.В., Пеньевская Н.А. Особенности эпидемической ситуации по сибирскому клещевому тифу и другим клещевым риккетсиозам в Российской Федерации, прогноз на 2019 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2019. № 1. С. 89–97. [Rudakov N.V., Shpynov S.N., Trankvilevsky D.V., Pakskina N.D., Savel'ev D.A., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Pen'evskaya N.A. Features of the epidemiological situation on siberian tick typhus and other tick-borne ricketsioses in the Russian Federation, prognosis for. *Problemy osobo opasnyh infekcij = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2019, no. 1, pp. 89–97. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2019-1-89-97*
10. Филиппова Н.А. Таксономическая внутривидовая дифференциация у иксодовых клещей (Acari: Ixodidae) с позиций морфологической концепции вида // Паразитология. 2007. Т. 41, № 6. С. 409–427. [Filippova N.A. Intraspecific taxonomic differentiation in ticks (Acari: Ixodidae) in the view of the morphological conception of species. *Parazitologiya = Parasitology, 2007, vol. 41, no. 6, pp. 409–427. (In Russ.)*]
11. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В. Иммуноферментная тест-система для выявления риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки // Лабораторное дело. 1991. № 11. С. 67–69. [Shpynov S.N., Rudakov N.V., Enzyme immunoassay system for detecting rickettsias of the tick-spot fever group. *Laboratornoe delo = Laboratornoe Delo, 1991, no. 11, pp. 67–69. (In Russ.)*]
12. Щучинова Л.Д., Злобин В.И., Ечешева А.В., Бондаренко Е.И. Современные эпидемиологические черты сибирского клещевого тифа в Республике Алтай // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 6. [Schuchinova L.D., Zlobin V.I., Echesheva A.V., Bondarenko E.I. Modern epidemiological featuresof the siberian tick typhus in the Altai Republic. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education, 2017, no. 6. (In Russ.)*] *URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=27089 (19.02.2023)*

13. Granitov V., Shpynov S., Beshlebova O., Arsenjeva I., Dedkov V., Safonova M., Stukolova O., Pantjukhina A., Tarasevich I. New evidence on tick-borne rickettsioses in the Altai region of Russia using primary lesions, serum and blood clots of molecular and serological study. *Microbes Infect., 2015, vol. 17, no. 11–12, pp. 862–865. doi: 10.1016/j.micinf.2015.08.011*
14. Igolkina Y., Krasnova E., Rar V., Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of Rickettsia raoultii and Rickettsia sibirica DNA in clinical samples. *Clin. Microbiol. Infect., 2018, vol. 24, no. 2, pp. 199.e9–199.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.003*
15. Igolkina Y., Rar V., Yakimenko V., Malkova M., Tancev A., Tikunov A., Epikhina T., Tikunova N. Genetic variability of Rickettsia spp. in Ixodes persulcatus/Ixodes trianguliceps sympatric areas from Western Siberia, Russia: Identification of a new Candidatus Rickettsia species. *Infection, Genetics and Evolution, 2015, no. 34, pp. 88–93. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.015*
16. Mediannikov O., Sidelnikov Y., Ivanov L., Fournier P.E., Tarasevich I., Raoult D. Far eastern tick-borne rickettsiosis: identification of two new cases and tick vector. *Ann. NY Acad. Sci., 2006, vol. 1078, pp. 80–88. doi: 10.1196/annals.1374.010*
17. Mediannikov O., Sidelnikov Y., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.-E., Tarasevich I., Raoult D. Acute tick-borne rickettsiosis caused by Rickettsia heilongjiangensis in Russian Far East. *Emerg. Infect. Dis., 2004, vol. 10, no. 5, pp. 810–817. doi: 10.3201/eid1005.030437*
18. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. Detection of a rickettsia closely related to Rickettsia aeschlimannii, "Rickettsia heilongjiangensis", Rickettsia sp. strain RpA4, and Ehrlichia muris in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *J. Clin. Microbiol., 2004, vol. 42, no. 5, pp. 2221–2223. doi: 10.1128/JCM.42.5.2221-2223.2004*
19. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D. Detection of members of the genera Rickettsia, Anaplasma, and Ehrlichia in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. NY Acad. Sci., 2006, vol. 1078, pp. 378–383. doi: 10.1196/annals.1374.075*
20. Shpynov S., Parola P., Rudakov N., Samoilenko I., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in Dermacentor ticks from Russia and central Kazakhstan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2001, vol. 20, no. 12, pp. 903–905. doi: 10.1007/s10096-001-0638-4*

Авторы:

Штрек С.В., к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией зоонозных инфекций отдела природно-очаговых бактериальных зоонозов ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия; доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;
Рудаков Н.В., д.м.н. профессор, директор ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия; зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;
Шпынов С.Н., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории зоонозных инфекций отдела природно-очаговых бактериальных зоонозов (ПОБЗ) ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;
Санников А.В., младший научный сотрудник лаборатории зоонозных инфекций отдела ПОБЗ ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия;
Самойленко И.Е., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории зоонозных инфекций отдела ПОБЗ ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, г. Омск, Россия;
Щучинова Л.Д., д.м.н., начальник отдела Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Алтай, г. Горно-Алтайск, Республика Алтай;
Троценко О.Е., д.м.н., директор ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Драгомерецкая А.Г., к.м.н., начальник отдела природно-очаговых инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;
Матущенко Е.В., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия.

Authors:

Shtrek S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Zoonotic Infections, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Rudakov N.V., DSc (Medicine), Professor, Director of Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation; Head of the Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Shpynov S.N., DSc (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Natural Focal Infections, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation; Professor, Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Sannikov A.V., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal Infections, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation;
Samoylenko I.E., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Natural Focal Infections, Department of Natural Focal Bacterial Zoonoses, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation;
Shchuchinova L.D., DSc (Medicine), Head of the Department of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Republic of Altai, Gorno-Altaisk, Russian Federation;
Trotsenko O.E., DSc (Medicine), Director of Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Khabarovsk, Russian Federation;
Dragomeretskaya A.G., PhD (Medicine), Head of the Department of Natural Focal Infections, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;
Matushchenko E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology and Virology and Immunology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.08.2022
Принята к печати 11.02.2023

Received 12.08.2022
Accepted 11.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 107–118

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 107–118

ANTIVIRAL PROPERTIES OF VERDAZYLS AND LEUCOVERDAZYLS AND THEIR ACTIVITY AGAINST GROUP B ENTEROVIRUSES

A.S. Volobueva[a], V.V. Zarubaev[a], T.G. Fedorchenko[b], G.N. Lipunova[b], V.N. Tungusov[c], O.N. Chupakhin[b]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation*
[c] *The Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation*

Abstract. Enteroviruses are non-enveloped viruses of *Enterovirus* genus, *Picornaviridae* family, causing a variety of human diseases: from acute respiratory and intestinal infections to more severe pathologies including poliomyelitis, encephalitis, myocarditis, pancreatitis. Currently, no approved direct-acting antiviral drugs for treatment of enterovirus infections exists, whereas vaccination is available only for prevention of poliomyelitis and enterovirus 71 infection. Therefore, it is promising to conduct a search for inhibitors of enteroviruses life cycle in drug development to treat enterovirus infections. Here, antiviral properties of stable free radicals, verdazyls, and their precursors, leucoverdazyls, were investigated. It has been shown that leucoverdazyls vs verdazyls increased the survival of permissive cell culture infected with coxsackievirus. The activity range of the lead leucoverdazyl against RNA-containing and DNA-containing human viruses (in the viral yield reduction assay) and its proposed mechanism of action (time of addition assay) was studied. The lead compound suppressed reproduction of group B enteroviruses *in vitro*, with modest activity against influenza A virus and no activity against herpes virus type 1 and adenovirus type 5. The maximum decrease in viral titers was observed upon its addition to infected cells during early and middle stages of the virus life cycle. Thus, we concluded that the studied compound has a pronounced inhibitory activity against group B enteroviruses not belonging to the class of capsid binder inhibitors, without virucidal properties. Previously, we described antioxidant properties of leucoverdazyls. It is known that many viral infections are accompanied by production of reactive oxygen species and oxidative stress, and some compounds with antioxidant properties exhibit antiviral potential. Targeted chemical modifications of leucoverdazyls and further studies of leucoverdazyl mechanism of action as well as *in vivo* animal studies are needed. However, the results obtained may be useful for future development of new antiviral drugs to treat enteroviral infections.

Key words: *Enteroviruses, enteroviral infection, Coxsackievirus, verdazyles, leucoverdazyles, antiviral activity, antioxidants.*

Адрес для переписки:
Волобуева Александрина Сергеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (921) 365-05-48.
E-mail: sasha-khrupina@mail.ru

Contacts:
Aleksandrina S. Volobueva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 365-05-48.
E-mail: sasha-khrupina@mail.ru

Для цитирования:
Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Федорченко Т.Г., Липунова Г.Н., Тунгусов В.Н., Чупахин О.Н. Противовирусные свойства вердазилов и лейковердазилов и их активность в отношении энтеровирусов группы В // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 107–118. doi: 10.15789/2220-7619-VAL-2065

Citation:
Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Tungusov V.N., Chupakhin O.N. Antiviral properties of verdazyls and leucoverdazyls and their activity against group B enteroviruses // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 107–118. doi: 10.15789/2220-7619-VAL-2065

© Volobueva A.S. et al., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-VAL-2065

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ВЕРДАЗИЛОВ И ЛЕЙКОВЕРДАЗИЛОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ ГРУППЫ В

Волобуева А.С.[1], Зарубаев В.В.[1], Федорченко Т.Г.[2], Липунова Г.Н.[2], Тунгусов В.Н.[3], Чупахин О.Н.[2]

[1] ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[2] Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия
[3] Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Энтеровирусы — группа безоболочечных вирусов рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*, вызывающих разнообразные заболевания человека: от острых респираторных и кишечных до более тяжелых, включая полиомиелит, энцефалит, миокардит, панкреатит. На сегодняшний день отсутствуют зарегистрированные противовирусные препараты прямого действия для терапии энтеровирусных инфекций, вакцинация доступна только для профилактики полиомиелита и инфекции, вызванной энтеровирусом 71. Перспективен поиск молекул — ингибиторов жизненного цикла энтеровирусов для разработки новых лекарственных средств для терапии энтеровирусных инфекций. В данной работе были исследованы противовирусные свойства стабильных свободных радикалов — вердазилов, и их предшественников — лейковердазилов. Было показано, что лейковердазилы, в отличие от вердазилов, способны повышать выживаемость пермиссивной клеточной культуры при инфицировании вирусом Коксаки. Был исследован спектр активности соединения-лидера в отношении РНК-содержащих и ДНК-содержащих вирусов человека (методом снижения титра вирусного потомства) и его предполагаемый механизм действия (в тесте на время добавления исследуемого соединения). Соединение-лидер мощно подавляло репродукцию энтеровирусов группы В *in vitro*, обладало слабой активностью в отношении вируса гриппа А, при этом активность в отношении вируса герпеса 1 типа и аденовируса 5 типа отсутствовала. Наблюдалось максимальное снижение вирусных титров при добавлении этого соединения к инфицированным клеткам на ранних и средних стадиях жизненного цикла вируса. Таким образом, заключили, что исследованное соединение обладает выраженной ингибирующей активностью в отношении энтеровирусов группы В, при этом оно не относится к классу ингибиторов связывания капсида (в отличие от вещества сравнения плеконарила) и не проявляет вирулицидных свойств. Ранее были описаны антиоксидантные свойства лейковердазилов. Известно, что многие вирусные инфекции сопровождаются образованием активных форм кислорода и окислительным стрессом, а ряд соединений с антиоксидантными свойствами обладают противовирусным потенциалом. Необходимо расширить библиотеку лейковердазилов за счет направленных химических модификаций, выполнить дальнейшие исследования механизма действия лейковердазилов и исследования *in vivo* на животных моделях энтеровирусных инфекций. Тем не менее результаты исследования могут быть полезными для будущей разработки новых противовирусных препаратов для терапии энтеровирусной инфекции.

Ключевые слова: *энтеровирусы, энтеровирусная инфекция, коксакивирус, вердазилы, лейковердазилы, противовирусная активность, антиоксиданты.*

Introduction

Enteroviruses (EV) are a diverse group of small icosahedral non-enveloped viruses with single-stranded non-segmented positive RNA genome belonging to the *Picornaviridae* family. Currently genus *Enterovirus* encompasses 15 species: Enterovirus A-L and Rhinovirus A-C [29]. They are able to survive harsh environments and can cause both asymptomatic infections and more severe diseases: poliomyelitis, myocarditis, pancreatitis, encephalitis. Enteroviral infections (EVI) are an important problem of public health worldwide. The main manifestations of enteroviral infection include hand-foot-mouth disease, acute hemorrhagic conjunctivitis, herpangina [2].

Though enteroviruses infect patients from different age groups, the most vulnerable categories of the population are newborns and children, who have a greater chance of developing complications. According to a recent systematic review of clinical characteristics of severe neonatal enterovirus infection, in newborns hepatitis and myocarditis were the most common severe complications, while the highest lethality rate (38.6%) was observed in neonates with myocarditis [34].

Enteroviruses are distinguished by their ability to cause outbreaks often in organized children's groups. Disease activity is seasonal (typically in the summer and early fall in temperate climate) and the emergence of leading serotypes responsible for seasonal infection incidence rising is unpredictable. According to CDC (Center for disease control) large outbreaks of EVI caused by EV68 in the form of SARS associated with acute flaccid myelitis were noted in the USA in 2014 and 2016 in children [8]. By the 1990s, Enterovirus A71 became endemic in the Asia-Pacific region, causing major outbreaks every 3–4 years [26]. In Russia the rise in the incidence of enterovirus infections in different periods was caused by various non-polio enteroviruses, and the spectrum of enteroviruses isolated from patients with enterovirus infection varies [3, 4].

The tendency to genetic recombination with the emergence of new strains, as well as high resist-

ance to environmental conditions provides their long-term persistence outside host organisms. Population mobility and labor migration are important factors of enteroviruses spreading to new territories in the modern world. The formation of carriage of viruses, accompanied by prolonged release of enteroviruses into the external environment, contributes to the persistence of enteroviruses in the human population.

Treatment of EVI is mainly supportive, focusing on the management of the most severe symptoms. Despite some prominent success in the field, vaccine development for the prevention of non-polio enterovirus infections is complicated due to their high phenotypic diversity. Currently only a limited number of vaccines were approved to combat EVI including three vaccines against EV71 that have been licensed by National Medical Products Administration of China [22].

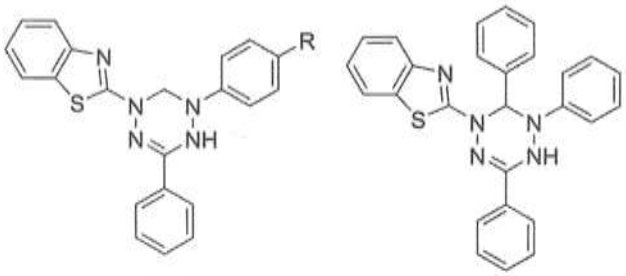
Much effort has been put into the development of antiviral drugs for the treatment of enteroviral infections. The following categories of direct enterovirus inhibitors targeting viral proteins were reported earlier: capsid binders (pleconaril and its derivatives), viral 3C protease inhibitors (rupintrivir and its analogs), drugs targeting viral replicative apparatus (both nucleoside analogs and non-nucleoside inhibitors) [1, 6]. Despite their activity in preclinical studies, none of them have been registered for EVI therapy due to lack of efficacy, poor pharmacokinetic profile, and/or adverse effects in clinical studies. Cellular proteins implicated in the viral life cycle may represent promising options for drug design [7, 33]. Drug repurposing screens also contributed to some progress in the field (for example, amiloride, fluoxetine) [25, 32]. However, it should be taken into account, that the potential application of repurposed drugs (for example, fluoxetine is an antidepressant, amiloride is a diuretic) can possibly cause unpredictable emergence of resistant strains if their intended use coincides with an asymptomatic EVI in a patient. Thus, there are no approved direct antiviral drugs for EVI treatment. The use of antiviral drugs will not only alleviate the disease in a particular patient, but will also reduce the release of the virus into the external environment. Therefore, there is a need for further search and development of novel antiviral drugs in view of clinical significance of enteroviral infection outbreaks.

We have recently reported new stable free radicals heterocyclic verdazyls containing a benzothiazole substituent [13, 14, 16] and their precursors — leucoverdazyls [15]. It should be noted that leucoverdazyls possess antioxidant activity, which suggests the presence of other types of activity.

In the present study, for the first time we investigated the antiviral activity of a small library of verdazyls and leucoverdazyls against group B enteroviruses. It was shown that leucoverdazyls (in contrast to verdazyls) potently suppress the reproduction of viral progeny *in vitro*. At the same time, the lead compound demonstrated modest activity towards influenza A virus and no activity against herpes simplex virus and adenovirus. For the lead compound studies of the putative mechanism of action were performed. Our study clearly demonstrated that leucoverdazyls are a promising group of novel heterocyclic compounds in view of EVI management. The results obtained can be further used for the development of antiviral drugs for the treatment of enterovirus infections.

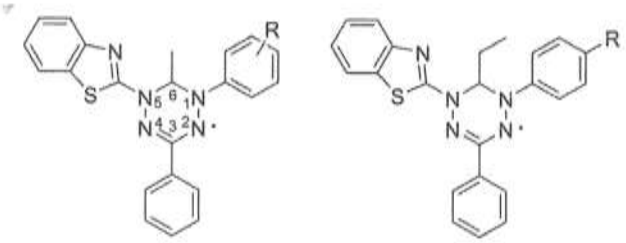
Materials and methods

Objects of the study. The leucoverdazyls 2-(1-aryl-3-phenyl-5,6-dihydro-4H-1,2,4,5-tetrazin-1-yl)-1,3-benzothiazoles (Fig. 1) were synthesized by alkylation of 1-aryl-5-(1,3-benzothiazol-2-yl)-3-phenylformazans with haloalkanes in alcoholic alkali, followed by cyclization of N-alkyl derivatives, according to the procedure described previously [15].

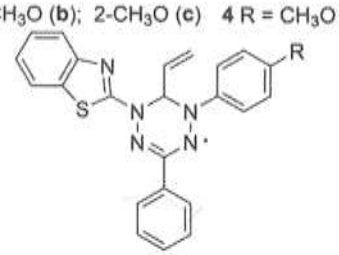


1 R = OCH_3 (**a**); F (**b**) **2**

Figure 1. Structures of 2-(1-aryl-3-phenyl-5,6-dihydro-4H-1,2,4,5-tetrazin-1-yl)-1,3-benzothiazoles used in the study

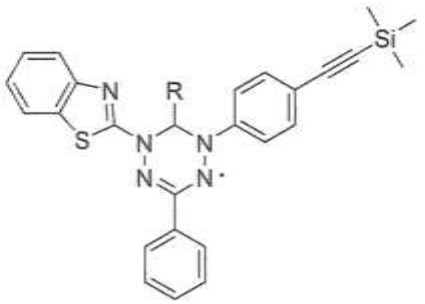


3 R = H (**a**); 4-CH_3O (**b**); 2-CH_3O (**c**) **4** R = CH_3O (**a**); F (**b**)



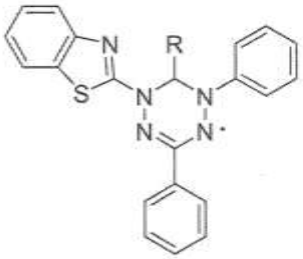
5 R = CH_3O (**a**); F (**b**)

Figure 2. Structures of 6-alkyl-5-aryl-1-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-phenylverdazyls and 5-aryl-1-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-phenyl-6-vinylverdazyls used in the study



6 R = CH_2=CH- (**a**); Ph (**b**)

Figure 3. Structures 5-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-3-pheny-1-[4 phenylethynyl) phenyl] verdazyls used in the study



7 R = H (**a**); CH_3 (**b**)

Figure 4. Kuhn verdazyls used in the study

The synthesis of verdazyls (Fig. 2) were performed according to a previously published method [14]. The starting formazans were alkylated with various alkylating agents in EtOH for 15 min. After removing EtOH and the excess of alkylating agent, the respective N-alkylformazans were cyclized in heptane. Heptane was removed by distillation, and the obtained leucoverdazyls were oxidized using a 12-fold excess of PbO_2 in Me_2CO. Verdazyls were isolated in 35–50% yields after purification by column chromatography.

The Ethynyl derivatives (Fig. 3) were synthesized from 5-(benzothiazol-2-yl)-1-(4-iodophenyl)-3-phenyl-6-vinyl(phenyl)verdazyls using Sonogashira cross-coupling reactions carried out in two stages according to a previously published method [16].

Kuhn verdazyls (Fig. 4) were synthesized by the known procedure [21].

Reference compound pleconaril was generously provided by Dr. V.A. Makarov (Federal Research Center, Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia).

Viruses and cells. Influenza A virus (IAV, strain A/Puerto Rico/8/1934 H1N1), Coxsackievirus 3 (CVB3, strain Nancy), Coxsackievirus 4 (CVB4, strain Powers), Herpes simplex virus type 1 (HSV1) and Human adenovirus 5 (Ad5) were obtained from the collection of viruses of the Pasteur Institute (St. Petersburg, Russia). Clinical isolate of Coxsackievirus 5 (CVB5) was kindly provided by the Regional Centre for Epidemiological Surveillance of Poliomyelitis (St. Petersburg, Russia). The following permissive cell lines were used in the studies: MDCK (ATCC #CCL-34), Vero (ATCC #CCL-81), A549 (ATCC #CCL-185). Infectious titers (in 50%-tissue culture infection dose, $TCID_{50}$) were determined in MDCK for IAV, in Vero cells for CVB3, CVB4, CVB5, HSV1 and in A549 cells for Ad5 by endpoint dilution assay using the following procedure. Permissive cells were seeded into 96-well plates in Eagle minimal essential medium (MEM, Paneco, Russia) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA). After 24 h, the media was aspirated, the wells were washed with saline, fresh MEM without FBS was added to the wells and the cells were infected with serial tenfold dilutions of virus stocks (100 μL per well, 4 wells for each dilution). The plates were incubated at +37°C in 5% CO_2 and observed daily for cytopathic effect (CPE). After 72 h (for enteroviruses and IAV) or 96 h (for HSV1 and Ad5), the viral titer was calculated in $TCID_{50}$ using the method of Spearman–Karber.

Cytoprotection assay. Vero cells were seeded in 96-well plates 24 h before the assay. Cells were washed with saline and serial dilutions of tested compounds in MEM without FBS were added to cells. No compounds were added to virus control wells. The plates were incubated for 1 h at 37°C at 5% CO_2. Then the cells were infected with CVB3 Nancy (m.o.i range of 1–0,001) and incubated for 72 h at 37°C at 5% CO_2. No virus was added to cytotoxicity control wells. Thereafter cell viability was assessed by MTT test using the following procedure. The cells were washed with saline, and a solution of Thiazolyl blue tetrazolium bromide (AppliChem, USA) (0.5 μg/mL) in MEM was added to the wells (100 μL per well). After 2 h of incubation at 37°C in 5% CO_2, the supernatant from wells was discarded, and the formazan residue was dissolved in DMSO (100 μL per well). The optical density of cells was then measured on a Multiskan multifunctional reader (ThermoScientific, Shanghai, China) at a wavelength of 540 nm.

The cytoprotective activity of compounds was considered as their ability to increase the values of OD compared to control wells (with virus only). Based on the results obtained, the values of EC_{50}, i.e. the concentration leading to 50% cytoprotection after infection of cells, was calculated using GraphPad Prism 6.01 software.

Cytotoxicity assay. MTT test was used to study the cytotoxicity of the compounds. The permissive cells were seeded in 96-well plates in Eagle minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% FBS. After 24 h, the media was removed, and the wells were washed with saline. Compounds were dissolved in DMSO, and a series of two-fold dilutions of each compound (1000–4 μg/mL) in MEM without FBS were prepared and added to the cells in triplicates (200 μL per well). The maximal concentra-

tion of DMSO was 0.5%, MEM with 0.5% DMSO was added to cell control wells. Cells were incubated for 24 h or 48 h at 37°C in 5% CO_2 in the presence of the dissolved compounds. Thereafter the MTT was performed as described above (see "Cytoprotection assay" item). The optical density of cells was then measured on Multiskan multifunctional reader (ThermoScientific, Shanghai, China) at a wavelength of 540 nm and plotted against the concentration of the compounds to generate the dose–response curve. The 50% cytotoxic dose (CC_{50}) of each compound (i.e., the compound concentration that causes the death of 50% of cells in a culture, or decreases the optical density twice as compared to the control wells) was calculated using four-parameter logistic nonlinear regression model (GraphPad Prism 6.01).

Virus yield reduction assay. Antiviral activity of the compounds was further evaluated using viral yield reduction assay. The corresponding permissive cell lines were seeded in MEM supplemented with 5% FBS in 24-well plates. When the cells confluence reached 100%, the compounds tested were dissolved in DMSO, and a series of three-fold dilutions of each compound in MEM without FBS was added to the cells and incubated at 37°C in 5% CO_2. After 1 h, the medium was discarded, equal volumes of fresh serial dilutions of each compound and viral suspension in MEM without FBS at MOI 0.01 was added to all the wells of the plate. In cell control wells only MEM without FBS was added. In virus control wells no compounds were added. The plates were incubated at 4°C for 1 h. Thereafter, the unbound virus was washed away and three-fold dilutions of each compound in MEM without FBS was added to the wells (1 mL). After 24 h (for enteroviruses and IAV) of 48 h (for HSV1 and Ad5) of incubation at 37°C in 5% CO_2, the infectious titer of viral progeny in cell supernatant (in $TCID_{50}$) for each compound concentration, cell control, and virus control wells were determined in permissive cell lines by endpoint dilution assay.

The titer of virus progeny (% relative to the virus control) was plotted against log concentration of the compounds used to generate the dose–response curve. The 50% virus-inhibiting concentration (IC_{50}) of each compound tested (the concentration leading to 50% inhibition of virus reproduction after infection of cells) was calculated using four-parameter logistic nonlinear regression model (GraphPad Prism 6.01). Selectivity index (SI) was calculated as a ratio of CC_{50} to IC_{50} values.

Virucidal assay. For virucidal assay a serial dilution of the leader compound in serum-free MEM was mixed with equal volume of 10^4 $TCID_{50}$ of Coxsackievirus B4 (Powers) in sterile test tubes and incubated at room temperature for 1 h. 96% ethanol was used as a control. In 1 h of incubation, the infectious titer of CVB4 was evaluated by endpoint dilution assay in Vero cells as described above (see "Viruses and cells" item).

Time-of-addition assay. Time of addition assay was performed according to the recommendation described in [11]. Vero cells were seeded in 24-well plates in 24 h before the beginning of the assay to reach a confluence of 90%. The leader compound was sequentially added in concentration of 25 μM in the following time points to the respective individual wells in the plate: (–2), (–1), 0, 2, 4, 6, where (–2) means 1 h before addition of the virus, (–1) — addition of the virus, 0 — completion of viral sorption on the cell surface, 2, 4, 6 — 2, 4 or 6 h after of virus sorption and washout of non-adsorbed virus. At (–1) suspension of 10^6 $TCID_{50}$ of CVB4 was added to all the wells except cell control and the plate was incubated at +4°C for 1 h in order to synchronize the infection in all conditions, the unbound virus was washed thereafter and the plate was returned to +37°C. Capsid-binder pleconaril was used as a control. In 8 h after the completion of virus sorption the experiment was stopped and the infectious viral titer was measured in each well using end-point titration in Vero cells.

Statistics. All *in vitro* experiments were repeated three times. The results were analyzed using GraphPad Prism 6.01. The values of CC_{50}, EC_{50} and IC_{50} were represented as mean±SD.

Results

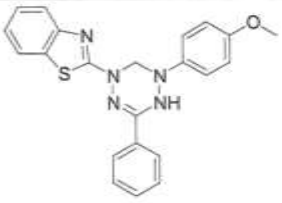
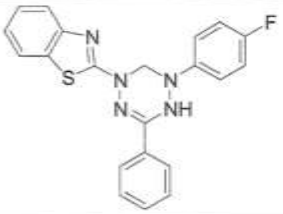
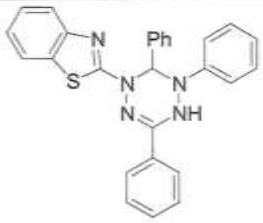
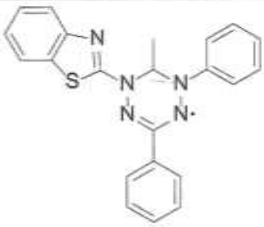
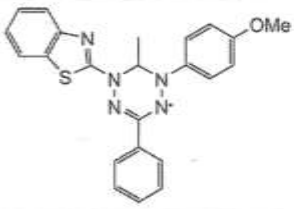
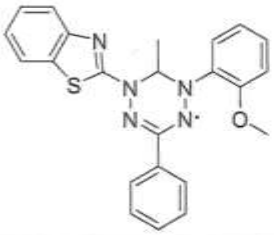
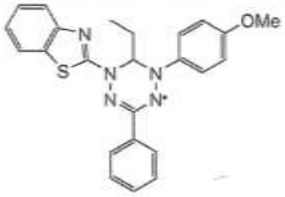
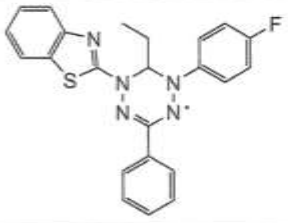
Leucoverdazyls exhibit cytoprotective and virus inhibiting activity in Coxsackievirus B3 infection *in vitro* at low micromolar concentrations

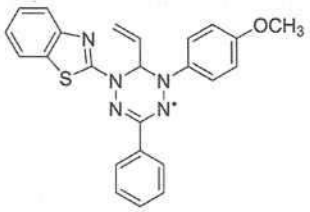
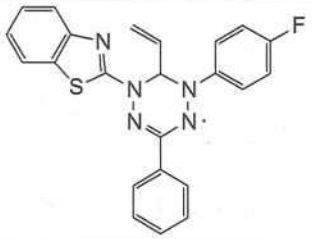
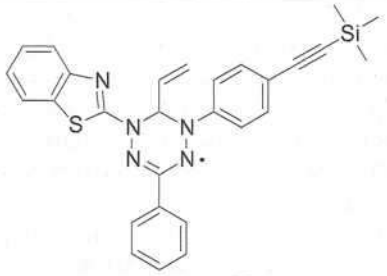
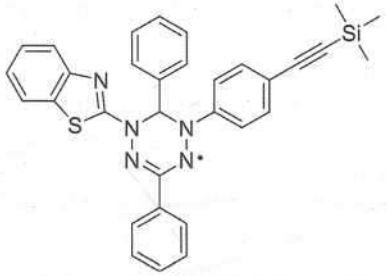
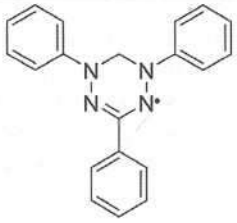
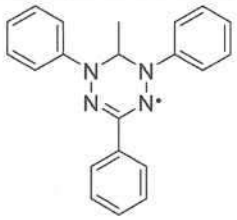
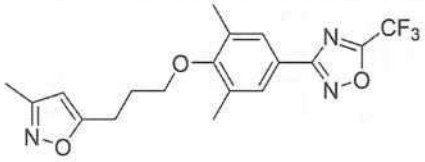
In the beginning of our study, cytoprotective properties of first 3 leucoverdazyls and 11 verdazyls against pleconaril-resistant strain Coxsackievirus B3 Nancy were determined using cytoprotection assay [28]. This assay allows to evaluate cell survival depending on concentration of tested compounds after infection with a virus. Cell survival is assessed by MTT assay based on the measurement of cell respiration activity. Pleconaril was used as a reference drug. The results of cytoprotection assay are presented in the Table 1 below.

As can be seen from Table 1 verdazyls had no cytoprotective effect *in vitro* upon CVB3 infection. In contrast, leucoverdazyl 1a (1 out of 3 tested) was able to increase cell viability in comparison to virus control. Its selectivity was comparable with the reference drug pleconaril. We, therefore, focused our further investigations on this compound, 1a.

To confirm virus-inhibition activity of 1a, we performed a viral yield reduction test. As described above, this test measures the titer of viral progeny in the supernatant of the infected culture depending on the compound concentration. Therefore, it is possible to evaluate antiviral activity of the compounds. The results of viral yield reduction assay are summarized in the Fig. 5 below.

Table 1. Results of cytoprotection assay against CVB3 Nancy

Number	Structure	CC_{50}, μM *	EC_{50}, μM **	SI ***
1a		150.7±20.2	< 9	> 16
1b		12.8±2.1	10 ±1.7	> 1
2		> 671	> 671	> 1
3a		> 781	> 781	> 1
3b		> 233	> 233	> 1
3c		> 241	> 241	> 1
4a		> 233	> 233	> 1
4b		> 240	> 240	> 1

Number	Structure	CC_{50}, μM *	EC_{50}, μM **	SI ***
5a		> 234	> 234	> 1
5b		> 724	> 724	> 1
6a		> 203	> 203	> 1
6b		> 184	> 184	> 1
7a		> 319	159.2±16.5	< 1
7b		> 305	33.5±4.1	< 1
Pleconaril		57.4±6.1	2.6±0.3	22

Notes. *CC_{50} is the cytotoxic concentration, the concentration resulting in death of 50% cells; CC_{50} were evaluated after 72 h of incubation of Vero cells with compound alone. **EC_{50} is the 50% cytoprotective concentration, the concentration leading to 50% cytoprotection after infection of cells with CVB3 (at m.o.i 0.001); ***SI is the selectivity index, the ratio of CC_{50}/EC_{50}. The data presented were obtained from three independent experiments and CC_{50} and EC_{50} are shown as mean ± SD. < indicates lower than minimal tested concentration, > indicates higher than the maximum tested concentration.

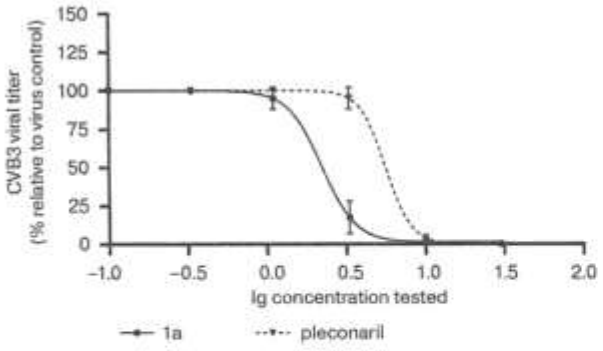


Figure 5. Virus-inhibiting properties of 1a against Coxsackievirus B3 (Nancy) in viral yield reduction assay

Notes. Virus-inhibiting activity of compound 1a against Coxsackievirus B3 (Nancy) based on viral yield assay results. The titer of viral progeny in Vero supernatants was evaluated relative to the titer in virus control and plotted against log compound concentration. Pleconaril was used as a reference compound. IC_{50} values for 1a and for pleconaril were as follows: 5.4±0.8 μM and 15.2±1.8 μM, respectively. IC_{50} is the 50% virus-inhibiting concentration, the concentration leading to 50% inhibition of virus reproduction after infection of cells (at m.o.i 0.01); The data presented as the mean of three independent experiments. Values are the mean ±SD of three independent experiments.

As can be seen from Fig. 5, the results of viral yield reduction assay supported the results of cytoprotection assay. Leucoverdazyl 1a demonstrated remarkable anti-enteroviral activity *in vitro* against pleconaril resistant CVB3 strain with micromolar IC_{50} value lower than that of pleconaril. Cytotoxicity of 1a and pleconaril was determined using MTT assay after 24-hour incubation of Vero cells with serial dilutions of the compounds tested. The following CC_{50} values were obtained: for 1a CC_{50} > 1347 μM and for pleconaril CC_{50} = 656±52 μM. The selectivity index (SI) values were calculated as the ratio of CC_{50}/IC_{50}: > 249 for 1a and 43 for pleconaril, respectively. 1a was less toxic than pleconaril and its selectivity towards CVB3 was superior to pleconaril.

Table 2. *In vitro* activity of 1a against some enteroviruses of group B

	CC_{50}, μM *	IC_{50}, μM**	SI***
1a			
CVB4	> 1347	0.72±0.21	> 1924
CVB5	> 1347	0.85±0.15	> 1587
Pleconaril			
CVB4	656±52	1.91±0.17	364
CVB5	656±52	< 0.1	> 6560

Notes. *CC_{50} is the cytotoxic concentration, the concentration resulting in death of 50% cells; CC_{50} were evaluated after 24 h of incubation of Vero cells with compound alone. **IC_{50} is the 50% virus-inhibiting concentration, the concentration leading to 50% inhibition of virus reproduction after infection of cells (at m.o.i of 0.01); ***SI is the selectivity index, the ratio of CC_{50}/IC_{50}. The data presented are the mean of three independent experiments. The CC_{50} and IC_{50} are presented as the mean ± error of the experiment. > indicates higher than the maximum tested concentration.

Table 3. Activity spectra of 1a towards RNA and DNA enveloped and non-enveloped viruses

	CC_{50}, μM*	IC_{50}, μM**	SI***
IAV	1246±180	50±6	25
HSV1	77±8	> 124	< 1
Ad5	623±7	> 124	< 6

Notes. *CC_{50} is the cytotoxic concentration, the concentration resulting in the death of 50% cells; CC_{50} were evaluated after 24 (MDCK cells for IAV) or 48 h (Vero cells for HSV1 and A549 cells for Ad5) of incubation with compound alone by using MTT test.**IC_{50} is the 50% virus-inhibiting concentration, the concentration leading to 50% inhibition of virus reproduction after infection of cells (at m.o.i 0.01); ***SI is the selectivity index, the ratio of CC_{50}/IC_{50}. The data presented as the mean of three independent experiments. The CC_{50} and IC_{50} are presented as the mean ± error of the experiment. > indicates higher than the maximum tested concentration. > indicates higher than the maximum tested concentration.

Activity spectra of 1a *in vitro*

In order to assess whether 1a possesses strain-specific or wider activity, we performed viral yield reduction assay using 1a and two pleconaril sensitive enteroviruses: Coxsackievirus B4 (strain Powers), Coxsackievirus B5 (clinical isolate). The results are presented in Table 2. Pleconaril was used as a reference drug.

The lead compound 1a showed prominent inhibitory activity against CVB4 and CVB5 *in vitro*, which is indicative of high anti-enteroviral potential, though its activity against CVB5 was lower than of pleconaril.

Next, we investigated whether 1a suppresses enteroviruses' life cycle only or is capable of inhibiting other genetically diverse negative strand RNA or DNA viruses, its antiviral activity towards IAV (ssRNA-negative enveloped virus) and HSV1 (dsDNA enveloped virus) and Ad5 (dsDNA non-enveloped virus) was further evaluated in viral yield reduction assay (for the results see Table 3).

The compound showed only modest activity against RNA virus — Influenza A — in contrast to its inhibitory potential against Coxsackieviruses. The activity against DNA-viruses — Ad5 and HSV1 — was negligible. Therefore, it was suggested that 1a is specific against EV.

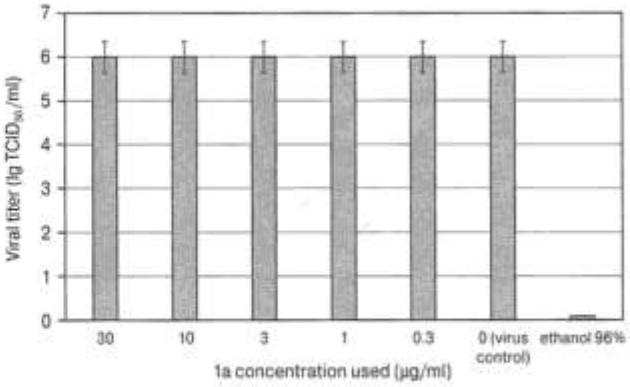


Figure 6. 1a shows no virucidal activity against Coxsackievirus B4 (Powers strain)

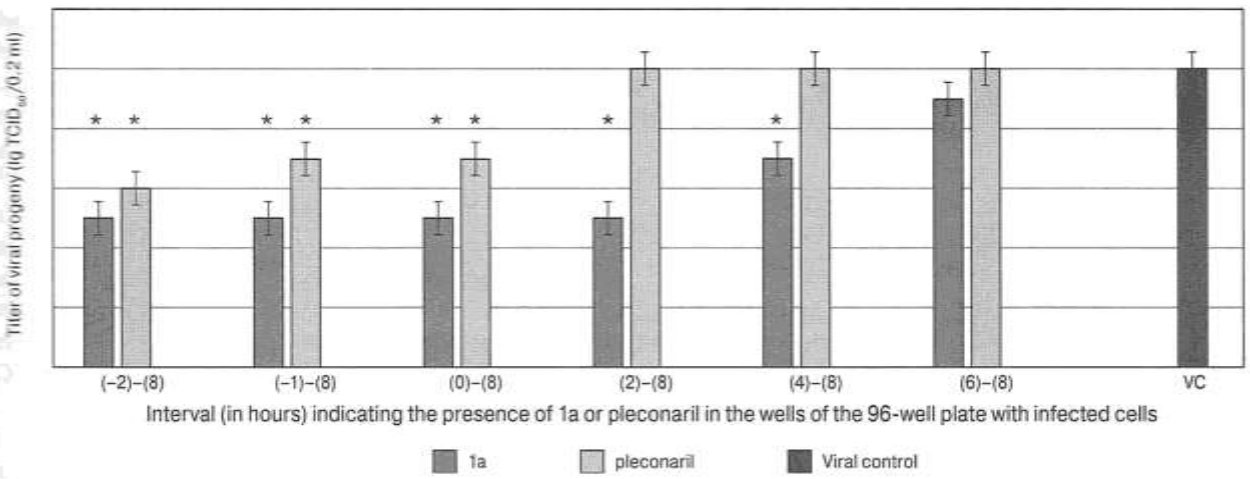


Figure 7. 1a inhibits early and middle stages of Coxsackievirus life cycle in Vero cells

Note. The activity of compound 1a against the Coxsackie B4 virus (Powers strain) depending on the time of addition to a permissive cell line upon CVB4 infection. Vero cells were infected with CVB4 (–1 h), 1a (25 μM) was added at the indicated time points (in hours) before the virus (–2 h), concomitantly with the virus (–1 h) and after (0, 2, 4, 6 h) infection, where 0 corresponds to the moment of completed virus absorption on the cell surface. The infectious activity of the viral progeny was evaluated by end-point titration in the Vero cells in lg $TCID_{50}$/0.2 ml. Pleconaril (25 μM) was used as a reference compound. Values are presented as the mean ± SD of three independent experiments. Asterisk indicates significance of difference in virus titer for 1a and pleconaril relative to the virus control, $p < 0.05$ by Mann–Whitney U-test.

1a inhibits early and middle stages of enterovirus life cycle

For 1a the possible mechanism of activity was studied in the following assays described below. Firstly, we investigated whether it has any virucidal activity. For this purpose, 1a was incubated with Coxsackievirus B4 (strain Powers) for 1 h and infectious titer was further determined in Vero cells using end-point titration assay (Fig. 6).

Thereafter, we focused on what stage of the viral cycle 1a displays the highest inhibiting activity. Using these results, it would be possible to deduce the viral or cellular proteins that could be a target for the compound. For this purpose, a time-of-addition assay was performed. We cultivated CVB4, adding and removing 1a at different time points regarding the infecting time. After one cycle of reproduction (8 hpi), the infectious titer of viral progeny was determined in end-point dilution assay (Fig. 7).

As can be seen from the data presented, the most pronounced effect of 1a was reached when it was present in the culture medium from –2 to 4 h post-infection (hpi). Inhibitory effect was absent after 4 hpi time point. Pleconaril used as a reference compound was mostly active from –1 point till 1 hpi as expected according to its capsid-binder characteristics. It belongs to the capsid binder group of antivirals which interact with various depressions on the surface of enteroviral capsid [5]. This interaction leads to stabilization of virus particles and prevents them from penetrating the cell.

Coxsackievirus lifecycle is relatively short (6–8 h) and its timing has been extensively studied previously in cell culture. According to the latest research viral genomic RNA is visible inside the cell until 1–2 hpi, the replication of the viral RNA starts 2–3 h after infection and the translation — at 3–4 hpi, viral progeny capsid proteins are detected after 4 hpi [27]. Therefore, the inhibitory effect of 1a spans the following stages of the virus life cycle: cell attachment, penetration, genomic RNA transcription, proteolytic processing and RNA replication.

Discussion

Enteroviral infection affects millions of people worldwide. Despite wide distribution of enteroviruses and economic damage from cases of temporary disability caused by enterovirus infection, vaccination option is available only for polioviruses and EV7. Besides, there are no approved antivirals to treat non-polio enteroviral infections.

In the present study for the first-time we investigated antiviral properties of novel heterocyclic compounds — free radicals heterocyclic verdazyls and their precursors leucoverdazyls — against coxsackieviruses including strain, resistant to well-known drug — pleconaril — used herein as reference compound. It was revealed that leucoverdazyls but not verdazyls possess potent virus inhibiting activity against group B enteroviruses without affecting life cycle of genetically distinct DNA viruses (herpes virus and adenovirus) while having slight activity against IAV virus (enveloped virus with negative segmented ss-RNA). The maximum decrease in viral titers upon addition of 1a was observed in the early and middle stages of coxsackievirus life cycle: if 1a was added be-

fore virus or up to 4 h post infection. Leucoverdazyl 1a doesn't belong to capsid binder class of inhibitors and has no virucidal activity against coxsackievirus.

Previously we described antioxidant properties of leucoverdazyls [15]. Oxidative stress is in general an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and their removal by endogenous antioxidant cellular enzymes [23]. An increase in oxidative stress is associated with changes in cell metabolism and physiology, and has a strong effect on viral infection. ROS can be produced through various endogenous mechanisms: mitochondria, NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidases (NOX), cytochrome P450, endoplasmic reticulum, peroxisomes, lysosomes [24]. Mitochondria are regarded as the prime source of endogenous ROS due to their main role in oxidative ATP production.

Though virus-induced increased ROS levels trigger innate antiviral immunity, different viruses have elaborated various delicate strategies to manipulate mitochondrial respiratory and apoptotic functions to ensure a successful life cycle [17]. For example, adenovirus dampens mitochondria-dependent intrinsic apoptosis via adenoviral E1B 19K protein, which was one of earliest viral antagonists of Bcl-2 (a cellular protein that inhibits apoptosis) discovered. E1B 19K protein shares functional and structural homology with Bcl-2 and inhibits p53-dependent apoptosis. Influenza A virus infection causes an imbalance in the intracellular redox state, leading to depletion of glutathione (one of the most studied cell antioxidants) and an increase in NADPH oxidase 4 (NOX4)-mediated ROS production. This pro-oxidant state promotes viral replication including the folding of surface glycoproteins and the nucleus-cytoplasmic traffic of viral ribonucleoprotein [12]. EV71 infection also leads to increased ROS generation, accompanied by decreased levels of antioxidants (taurine and hypotaurine) [9]. It was shown, that enteroviral 2B protein interacts with mitochondrial voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3) — one of the pore-forming protein localized to the outer membrane of mitochondria, and this interaction is essential to mitochondrial ROS generation and viral replication [10]. It is described that oxidative stress elicited by viruses can promote inflammation and subsequent tissue destruction [30, 19].

It has been published previously that compounds with antioxidant properties may possess antiviral effects. For example, mitochondria-targeted antioxidants MitoTEMPO and Mitoquinone (MitoQ, synthetic analogue of coenzyme Q10) substantially inhibited enteroviruses replication *in vitro* and *in vivo* [9, 20]. In murine pancreatitis model of coxsackievirus B4 infection application of dihydroquercetin, a flavonoid from larch wood, provided decrease of virus titer in pancreatic tissue and restored impaired antioxidant properties in the tissue [18]. In the murine model of IAV, intranasal delivery of MitoTEMPO, resulted in a reduction in airway/lung inflammation, neutrophil infiltration, viral titers as well as morbidity and mortality of animals [30]. Replication of influenza virus was inhibited by the following antioxidants: pyrrolidine dithiocabamate, N-acetyl-l-cysteine, glutathione, nordihydroguaiaretic acid, resveratrol, ascorbic acid, 5,7,4-trihydroxy-8-methoxyflavone, catechins, quercetin 3-rhamnoside, isoquercetin and oligonol [31]. Therefore, use of antioxidants either in monotherapy or in combination with various direct acting antivirals targeting different steps in viral life cycle can be useful for the treatment of viral infection.

Conclusion

Leucoverdazyls are potent inhibitors of group B enteroviruses *in vitro*. Further studies are needed to elucidate their precise mechanisms of action including assessment of its direct impact on intracellular ROS generation, resistant clone selection and mapping of resistance mutations. It may be feasible to test its activity against group A and C enteroviruses and other viruses with (+) ssRNA genome and perform *in vivo* studies on animal models of EVI. We plan to expand the library of leucoverdazyls through targeted chemical modifications in order to disclose its pharmacophore and improve their virus-inhibiting properties. Nevertheless, the results of the study can serve as a basis for future development of novel antivirals to use in monotherapy or in combinational treatment of EVI.

Acknowledgements

The work was supported by a grant for young scientists from the St. Petersburg Pasteur Institute.

References

1. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Ланцева К.С. Разработка противовирусных препаратов для терапии инфекции коксакивируса В3 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 57–67. [Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Lantseva K.S. Development of antiviral therapeutics combating coxsackievirus type B3 infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no 1, pp. 57–67. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-DOA-1273*
2. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм// Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 1. С. 27–36. [Kanaeva O.I. Enterovirus Infection: variety of etiological factors and clinical manifestations. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 27–36. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-27-36*

3. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И, Шишко Л.А., Черкасская И.В., Кириллова Л.П. Вирусы Коксаки В1–6 как этиологический фактор энтеровирусной инфекции // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 2. С. 65–71. [Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Shishko L.A., Cherkasskaya I.V., Kirillova L.P. Coxsackieviruses B1–6 as Etiological Factor of Enterovirus Infection. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 65–71. (In Russ.)*]
4. Романенкова Н.И., Голицына Л.Н., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Зверев В.В., Созонов Д.В., Черкасская И.В., Кириллова Л.П., Ермакова М.В., Камынина Л.С., Петухова М.Б., Грицай А.Б., Новикова Н.А. Заболеваемость энтеровирусной инфекций и особенности циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов на некоторых территориях России в 2017 году // Журнал инфектологии. 2018. Т. 10, № 4. С. 124–133. [Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Zverev V.V., Sozonov D.V., Cherkasskaya I.V., Kirillova L.P., Ermakova M.V., Kamynina L.S., Petukhova M.B., Gritsay A.B., Novikova N.A. Enterovirus infection morbidity and peculiarities of nonpolio enteroviruses circulation on some territories of Russia in 2017. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2018, vol. 10, no. 4, pp. 124–133. (In Russ.)*] *doi: 10.22625/2072-6732-2018-10-4-124-133*
5. Anasir M.I., Zarif F., Poh C.L. Antivirals blocking entry of enteroviruses and therapeutic potential. *J. Biomed. Sci., 2021, vol. 28: 10. doi: 10.1186/s12929-021-00708-8*
6. Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol., 2018, vol. 16, pp. 368–381. doi: 10.1038/s41579-018-0005-4.*
7. Bauer L., Lyoo H., van der Schaar H.M., Strating J.R.P.M., Kuppeveld F.J.M. Direct-acting antivirals and host-targeting strategies to combat enterovirus infections. *Curr. Opin. Virol., 2017, vol. 24, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.009.*
8. Cassidy H., Poelman R., Knoester M., Van Leer-Buter C.C., Niesters H.G.M. Enterovirus D68 - The New Polio? Front Microbiol. 2018, vol. 13, no. 9, 2677. doi: 10.3389/fmicb.2018.02677.
9. Cheng M.L., Weng S.F., Kuo C.H., Ho H.Y. Enterovirus 71 induces mitochondrial reactive oxygen species generation that is required for efficient replication. *PLoS One, 2014, vol. 9, no. 11: e113234. doi: 10.1371/journal.pone.0113234.*
10. Cheng M.L., Wu C.H., Chien K.Y., Lai C.H., Li G.J., Liu Y.Y., Lin G., Ho H.Y. Enteroviral 2B interacts with VDAC3 to regulate reactive oxygen species generation that is essential to viral replication. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 8: 1717. doi: 10.3390/v14081717.*
11. Daelemans D., Pauwels R., De Clercq E. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds. *Nat. Protoc., 2011, vol. 6, pp. 925–933. doi: 10.1038/nprot.2011.330*
12. De Angelis M., Amatore D., Checconi P., Zevini A., Fraternale A., Magnani M., Hiscott J., De Chiara G., Palamara A.T., Nencioni L. Influenza virus down-modulates G6PD expression and activity to induce oxidative stress and promote its replication. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2022, vol. 6, no. 11: 804976. doi: 10.3389/fcimb.2021.804976.*
13. Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Shchepochkin A.V., Tsmokalyuk A.N., Slepukhin P.A., Chupakhin O.N. Synthesis and properties of 1,3-diphenyl-5-(benzothiazol-2-yl)-6-R-verdazyls. *Mendeleev Commun., 2018, vol. 28: 297. doi: 10.1016/j.mencom.2018.05.023*
14. Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Shchepochkin A.V., Tsmokalyuk A.N., Valova M.S., Slepukhin P.A. Synthesis, spectral and electrochemical properties of halogenated 6-alkyl-5-aryl-1-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-phenylverdazyls and 5-aryl-1-(benzo[d] thiazol-2-yl)-3-phenyl-6-vinylverdazyls. *Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2019, vol. 55, no. 6, pp. 560–565. doi: 10.1007/s10593-019-02496-4*
15. Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Shchepochkin A.V., Valova M.S., Tsmokalyuk A.N., Slepukhin P.A., Chupakhin O.N. Synthesis and spectral, electrochemical, and antioxidant properties of 2-(5-Aryl-6-R-3-phenyl-5,6-dihydro-4H-1,2,4,5-tetrazin-1-yl)-1,3-benzothiazole. *Russian Journal of Organic Chemistry, 2020, vol. 56, no. 1, pp. 38–48. doi: 10.1134/S1070428020010078*
16. Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Tsmokalyuk A.N., Shchepochkin A.V., Chupakhin O.N. Sonogashira cross-coupling reactions of 5-(benzothiazol-2-yl)- 1-(4-iodophenyl)-3-phenyl-6-vinyl(phenyl)verdazyls: synthetic and theoretical aspects. *Chem. Heterocycl. Compd., 2021, vol. 57, no. 1, pp. 40–48 doi: 10.1007/s10593-021-02865-y*
17. Foo J., Bellot G., Pervaiz S., Alonso S. Mitochondria-mediated oxidative stress during viral infection. *Trends Microbiol., 2022, vol. 30, no. 7, pp. 679–692. doi: 10.1016/j.tim.2021.12.011.*
18. Galochkina A.V., Anikin V.B., Babkin V.A., Ostrouhova L.A., Zarubaev V.V. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from Larix sibirica, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis. *Arch. Virol., 2016, vol. 161, pp. 929–938. doi: 10.1007/s00705-016-2749-3*
19. Hu S., Sheng W.S., Schachtele S.J., Lokensgard J.R. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. *J. Neuroinflammation, 2011, vol. 8: 123. doi: 10.1186/1742-2094-8-123.*
20. Kim S.R., Song J.H., Ahn J.H., Jeong M.S., Yang Y.M., Cho J., Jeong J.H., Cha Y., Kim K.N., Kim H.P., Chang S.Y., Ko H.J. Obesity exacerbates coxsackievirus infection via lipid-induced mitochondrial reactive oxygen species generation. *Immune Netw, 2022, vol. 22, no. 2: e19. doi: 10.4110/in.2022.22.e19.*
21. Kuhn R., Tuischmann H. Über Verdazyle, eine neue Klasse cyclischer N-haltiger Radikale. *Monatsh. Chem., 1964, vol. 95, no. 2, pp. 457–479. doi: 10.1007/BF00901311*
22. Li M.L., Shih S.R., Tolbert B.S., Brewer G. Enterovirus A71 vaccines. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 9, no. 3: 199. doi: 10.3390/vaccines9030199.*
23. Marengo B., Nitti M., Furfaro A.L., Colla R., Ciucis C.D., Marinari U.M., Pronzato M.A., Traverso N., Domenicotti C. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev., 2016, vol. 2016: 6235641. doi: 10.1155/2016/6235641.*
24. Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Cindric M., Mouthuy P.A., Zarkovic N. Short Overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells, 2019, vol. 8, no. 8: 793. doi: 10.3390/cells8080793*
25. Ogram S.A., Boone C.D., McKenna R., Flanegan J.B. Amiloride inhibits the initiation of Coxsackievirus and poliovirus RNA replication by inhibiting VPg uridylylation. *Virology, 2014, vol. 464–465, pp. 87–97. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.025.*
26. Puenpa J., Wanlapakorn N., Vongpunsawad S. The history of Enterovirus A71 outbreaks and molecular epidemiology in the Asia-Pacific Region. *J. Biomed. Sci., 2019, vol. 26, no. 75. doi: 10.1186/s12929-019-0573-2*

27. Salmikangas S., Laiho J.E., Kalander K., Laajala M., Honkimaa A., Shanina I., Oikarinen S., Horwitz M.S., Hyöty H., Marjomäki V. Detection of Viral-RNA and +RNA strands in Enterovirus-infected cells and tissues. *Microorganisms, 2020, vol. 8, no. 12: 1928. doi: 10.3390/microorganisms8121928*
28. Schmidtke M., Wutzler P., Zieger R., Riabova O.B., Makarov V.A. New pleconaril and [(biphenyloxy)propyl]isoxazole derivatives with substitutions in the central ring exhibit antiviral activity against pleconaril-resistant coxsackievirus B3. *Antiviral Res., 2009, vol. 81, no. 1, pp. 56–63. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.09.002.*
29. Simmonds P., Gorbalenya A.E., Harvala H., Hovi T., Knowles N.J., Lindberg A.M., Oberste M.S., Palmenberg A.C., Reuter G., Skern T., Tapparel C., Wolthers K.C., Woo P.C.Y., Zell R. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch. Virol., 2020, vol. 165, no. 3, pp. 793–797. doi: 10.1007/s00705-019-04520-6.*
30. To E.E., Erlich J.R., Liong F., Luong R., Liong S., Esaq F., Oseghale O., Anthony D., McQualter J., Bozinovski S., Vlahos R., O'Leary J.J., Brooks D.A., Selemidis S. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to pathological inflammation during influenza A virus infection in mice. *Antioxid. Redox Signal, 2020, vol. 32, no. 13, pp. 929–942. doi: 10.1089/ars.2019.7727.*
31. Uchide N., Toyoda H. Antioxidant therapy as a potential approach to severe influenza-associated complications. *Molecules, 2011, vol. 16, no. 3, pp. 2032–2052. doi: 10.3390/molecules16032032.*
32. Ulferts R., van der Linden L., Thibaut H.J., Lanke K.H., Leyssen P., Coutard B., De Palma A.M., Canard B., Neyts J., van Kuppeveld F.J. Selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine inhibits replication of Human Enteroviruses B and D by targeting viral protein 2C. *Antimicrob. Agents Chemother., 2013, vol. 57, no. 4, pp. 1952–1956. doi: 10.1128/AAC.02084-12*
33. Van der Schaar H.M., Leyssen P., Thibaut H.J., de Palma A., van der Linden L., Lanke K.H., Lacroix C., Verbeken E., Conrath K., Macleod A.M., Mitchell D.R., Palmer N.J., van de Poël H., Andrews M., Neyts J., van Kuppeveld F.J. A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host cell factor phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ. *Antimicrob. Agents Chemother., 2013, vol. 57, no. 10, pp. 4971–4981. doi: 10.1128/AAC.01175-13*
34. Zhang M., Wang H., Tang J. Clinical characteristics of severe neonatal enterovirus infection: a systematic review. *BMC Pediatr., 2021, vol. 21, no. 1: 127. doi: 10.1186/s12887-021-02599-y*

Авторы:
Волобуева А.А., научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Зарубаев В.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Федорченко Т.Г., к.х.н., научный сотрудник лаборатории координационных соединений Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия;
Липунова Г.Н., д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия;
Тунгусов В.Н., студент Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия;
Чупахин О.Н., академик РАН, д.х.н., зав. лабораторией координационных соединений Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Authors:
Volobueva A.S., Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Zarubaev V.V., DSc (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Fedorchenko T.G., PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Coordination Compounds, Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation;
Lipunova G.N., DSc (Chemistry), Leading Researcher, Laboratory of coordination compounds, Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation;
Tungusov V.N., Student, The Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation;
Chupakhin O.N., RAS Full Member, DSc (Chemistry), Head of the Laboratory of Coordination Compounds, Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.11.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 08.11.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 119–126

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 119–126

PHARMACEUTICAL ACTIVITY OF A SYNTHETIC HETEROCYCLIC ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) COMPOUND ON *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* AND *GIARDIA LAMBLIA*

H.M. Obaid[1], S.S. Sale[2], L. Boundenga[3,4]

[1] *Northern Technical University, College of Health and Medical Techniques, Kirkuk, Iraq*
[2] *Kirkuk University, College of Science, Kirkuk, Iraq*
[3] *International Centre for Medical Research of Franceville, Franceville, Gabon*
[4] *Durham University, Durham, United Kingdom*

Abstract. *Background.* Intestinal parasites are among the most important infectious agents with an impact on human health. Indeed, in the lack of an available treatment option, these parasites could constitute a real health problem in the population. In the present study, we investigated for the first time the effect of a novel synthetic heterocyclic (($C_{15}H_{12}N_5OCL$)2-(benzo(d)(1,2,3)triazol-1-yl)-N-benzylideneacetohydrazine) compound on two intestinal parasites (*Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*). *Methods.* The parasite isolates tested were collected from outpatients at the General Pediatric Hospital in Kirkuk, Iraq, between September 2019 and January 2020. Thus, we studied the *in vivo* and *in vitro* pharmaceutical activity of the ingredient on both parasites. The toxicological effects of the substance on some blood parameters and liver and kidney function tests were also studied. *Results.* After five days of treatment, the drug's *in vivo* action on *G. lamblia* resulted in an inhibition rate of 88.2% at a dose of 1 mg/kg. On the other hand, we observed that the influence of this synthetic substance on cultured *E. histolytica* was very close to the metronidazole effect. The maximum result was at a concentration of 1 g/ml and was obtained after 72 hours of incubation with an inhibition rate of 89.4%. The substance did not affect the blood parameters or the studied liver and kidney functions. *Conclusion.* It can be concluded that this substance is highly effective against both *E. histolytica* and *G. lamblia*, and that it has no toxic effects on the studied parameters. Therefore, it could be a promising pharmacophore for intestinal protozoan parasites including *E. histolytica* and *G. lamblia* and an alternative or competitor to the current medications available.

Key words: *pharmaceutical, activity, synthetized, heterocyclic compound, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia.*

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) СОЕДИНЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* И *GIARDIA LAMBLIA*

Обейд Х.М.[1], Сале С.С.[2], Бунденга Л.[3,4]

[1] *Северный технический университет, Колледж здравоохранения и медицинских технологий, г. Киркук, Ирак*
[2] *Киркукский университет, Научный колледж, г. Киркук, Ирак*
[3] *Международный центр медицинских исследований Франсвиля, г. Франсвиль, Габон*
[4] *Даремский университет, г. Дарем, Великобритания*

Резюме. *Актуальность.* Кишечные паразиты являются одними из наиболее важных инфекционных агентов, влияющих на здоровье человека. Действительно, при отсутствии доступного варианта лечения такие пара-

Адрес для переписки:
Хиро Мохаммед Обейд
Колледж здравоохранения и медицинских технологий,
г. Киркук, Ирак.
Тел.: +9647701281124. E-mail: dr.obaidhm13@gmail.com

Contacts:
Hiro Mohammed Obaid
College of Health and Medical Techniques, Kirkuk, Iraq.
Phone: +9647701281124. E-mail: dr.obaidhm13@gmail.com

Для цитирования:
Обейд Х.М., Сале С.С., Бунденга Л. Фармацевтическая активность синтетического гетероциклического ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) соединения в отношении Entamoeba histolytica и Giardia lamblia // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 119–126. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-2024

Citation:
Obaid H.M., Sale S.S., Boundenga L. Pharmaceutical activity of a synthetic heterocyclic ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) compound on Entamoeba histolytica and Giardia lamblia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 119–126. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-2024

© Obaid H.M., Sale S.S., Boundenga L., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PAO-2024

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

зиты могут представлять реальную проблему для здоровья населения. В настоящем исследовании мы впервые исследовали действие нового синтетического гетероциклического соединения [($C_{15}H_{12}N_5OCL$)2-(бензо(d)(1,2,3)триазол-1-ил)-N-бензилиденацетогидразин] в отношении двух кишечных паразитов (*Entamoeba histolytica* и *Giardia lamblia*). *Методы.* Тестируемые изоляты паразитов были собраны от амбулаторных пациентов в Главной детской больнице в Киркуке, Ирак, в период с сентября 2019 г. по январь 2020 г. Таким образом, мы изучили фармацевтическую активность использованного соединения *in vivo* и *in vitro* в отношении обоих паразитов. Токсичность вещества изучалась по некоторым показателям крови и функциональным пробам печени и почек. *Результаты.* После пяти дней лечения действие препарата *in vivo* на *G. lamblia* привело к степени ингибирования 88,2% при дозе 1 мг/кг. С другой стороны, мы наблюдали, что влияние указанного синтетического вещества на культуру *E. histolytica* было очень близко к действию метронидазола. Максимальный результат был получен при концентрации 1 г/мл через 72 ч инкубации со степенью ингибирования 89,4%. Соединение не влияло на показатели крови или изучаемые функции печени и почек. *Заключение.* Можно сделать вывод, что данное вещество обладает высокой эффективностью как в отношении *E. histolytica*, так и в отношении *G. lamblia* и не оказывает токсического действия. Таким образом, соединение может быть эффективным фармпрепаратом в отношении кишечных простейших паразитов, включая *E. histolytica* и *G. lamblia*, а также альтернативой или конкурентом доступных в настоящее время лекарственных средств.

Ключевые слова: *фармацевтика, активность, синтез, гетероциклическое соединение, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia.*

Introduction

Human gastrointestinal parasites are among the leading causes of disease worldwide, especially in undeveloped countries, where people still suffer from high rates of parasitic infections. Intestinal parasites are ingested with contaminated food and water and pass through the entire gastrointestinal tract. These gastrointestinal parasites constitute a real public health problem, as they represent a threat to the health of a large part of the population and can also lead to high mortality rates, exclusively in the absence of available treatment options [20, 30]. For many developing countries, metronidazole remains the drug of choice for treating intestinal parasite infections. Despite the widespread use of this compound in many countries, however, its use is not approved by the Food and Drug Administration (FDA) in some countries, such as the United States [12, 14].

Since the emergence of many cases of parasite resistance to this drug [11, 16, 19, 25, 32], several studies have been conducted with the objective of finding therapeutic alternatives to treat these parasites [2, 26, 29]. Also, it has been reported that metronidazole use could lead to several frightening side effects that could have detrimental effects on human health [21, 22] and that its long-term use could be carcinogenic [6] and/or cause damage to various parts of the brain [10, 21, 22].

For several years, numerous studies around the world have attempted to find other suitable compounds that can be used instead of metronidazole. Some substances like cryptdin-2 [26], hexadecyl-PC and other substances with longer alkyl chains [29] have been tested for their therapeutic activities against *E. histolytica* strains. These substances were found to be very effective at various concentrations [26, 29]. However, of all the compounds tested, oleyl-PC, octadecyl-PC, and non-adecenyl-PC had the highest effective concentrations, with concentrations ranging from 15–21 mM for strain SFL-3 and 73–98 mM for strain HM-1 after 48 hours of treatment [29].

In the *in vitro* test of kaempferol (KPF) as an anti-protozoal, with an effective concentration of fifty percent, was 7.9 g/mL for *E. histolytica* and 8.7 g/mL for *G. lamblia* [7]. Several synthetic compounds (5-(3-chlorophenyl)-1-methyl-4-nitro-1 H-imidazole, synthesized inhibitors of the Hsp90 class, and many other compounds) have been reported to have potential chemotherapeutic properties against *E. histolytica* and *G. intestinalis* [8, 27]. Thus, some of the compounds tested as alternatives to metronidazole have had encouraging results on intestinal tract parasites [15, 28].

However, despite the efforts already made to find alternative treatments for intestinal protozoa, there is still a need for further work in this area to find and propose new treatments from different sources in order to overcome the problem of resistance and harmful side effects of currently available pharmaceuticals. Thus, this study aimed to investigate the effect of a synthetic organic heterocyclic compound against two intestinal parasites, *E. histolytica* and *G. lamblia* because it has been shown to be highly effective against some resistant pathogenic bacteria.

Materials and methods

Study design

This study was designed to see if the newly synthesized organic heterocyclic compound ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) 2-(benzo(d) (1,2,3) triazol-1-yl)-N bennzylideneacetohydrazine) had any therapeutic effects on the intestinal parasites *E. histolytica* and *G. intestinalis* in laboratory mice and in culture.

The organic heterocyclic ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) ingredient

The composite used in our study was synthesized from a series of eleven novel heterocyclic compounds that were tested in a study on bacteria [26], in which

the fifth compound proved to be very effective against gram-positive and negative bacteria. The preparation of heterogeneous rings was carried out based on the reactance of benzotriazole present in some compounds (6, 7, 8, 9, 11) described previously in [1] and with chloroethyl acetate ester. Hydrazone was made from the condensation of hydrazide with the replacement of benzaldehyde in ethanol. From the reaction of an ester with aqueous hydrazine and the reaction of hydrazine with hydrazonebenzaldehyde, the heterocyclic effective compound (($C_{15}H_{12}N_5OCL$)2-benzo(d)(1,2,3) triazol_1_yl)_N_bennzylideneacetohydrazine) was formed. The structure of the synthesized ingredient was checked by calculating the melting point and the infrared spectrum. The specifications of the ingredient were as follows: IR =:1652 (C=O), 1620 (C=N), 3311 (NH), as.1265 (C-O-C), sy.1104 (C-O-C), 1HNMR = 3.6 ($O-CH_3$), 7-7.5 (4H-Ph), 8.1 (Ph-CH), 8 (NH), 5.1 ($N-CH_2$), R group: 2-Cl, UV spectrum: 294, molecular formula: $C_{15}H_{12}N_5OCL$, melting point: 210–212°C, harvested percentage: 57, color: leady, Fig. 1.

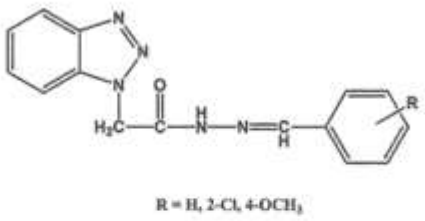


Figure 1. Molecular formula of the synthetic substance

Identification and isolation of the parasitic stages

In our study, parasite isolates were researched in samples of outpatients who suffered from diarrhea and who had attended the General Pediatric Hospital in Kirkuk, Iraq during the period between September 2019 and January 2021. The presence of cysts and trophozoite stages was confirmed by microscopic examination of the stool samples and the presence of RBCs in *Entamoeba* trophozoite. Another positive sample was requested for culture for some positive samples from patients in whom we found *E. histolytica* trophozoites. A small amount of the mucoid part of the sample was implanted directly onto the prepared medium for culture. The cystic stages of the two parasites were separated from human or mouse stool samples using the concentration sedimentation method.

Pharmaceutical activity of the heterocyclic compounds

In vivo pharmaceutical activity

To test the effect of the substance *in vivo*, male or female albino (Balb/C strain) mice weighing 25–30 grams were selected. The mice were raised under standard conditions and brought to the animal house of the College of Sciences at Kirkuk University. Mice were infected with *Giardia* by being orally dosed with a thousand cystic stages. The concentrations of 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 mg/kg of the substance were administered to mice orally three times daily for five days (six mice for each concentration) [34]. Parasite excretion in mice was monitored daily by examining the excretion patterns of the parasites in their feces. The mean number of cysts and trophozoite stages counted in 30–50 high microscopic fields was estimated. The inhibition ratio (control group–treated group/control group ×100) was calculated. 0.4% trypan blue was applied for staining. Metronidazole at a concentration of 0.8 mg/kg and a group dosed with the parasite without any treatment were used as a control group. Laboratory animal experiments and handling were designed based on the ethics and recommendations of protecting laboratory animals with the code (MUCEDLA-01) of the Ethics Committee for Animal Handling of the University of Kirkuk.

In vitro pharmaceutical activity of the heterocyclic ingredient

Preparation of culture media. For culturing *E. histolytica*, Boeck and Dr. Bohuslav's Locke-Egg-Serum (LES) medium were used [23]. First, the Locke solution was prepared, filtrated, and autoclaved. For the solid face of the culture, four eggs were mixed with 50 ml of Locke's solution and homogenized. The medium was solidified in a slant position. Finally, 2 mL of Locke's solution was added to each tube and re-autoclaved. The media was kept in the refrigerator until used [13]. 0.5 ml of inactivated human serum from a healthy person, 0.05 ml of stock antibiotic solution (100 U per ml of penicillin and 100 µg per ml of streptomycin) and a loopful of sterile starch were added to each tube and gently shaken directly before inoculation.

Culturing of E. histolytica. Approximately ten (10) tubes of culture media were warmed in an incubator at 35°C for 1 to 2 hours and inoculated with bloody mucoid diarrheic fresh stool samples from the outpatients who were diagnosed with *E. histolytica* trophozoites [13]. A small amount of mucus parts was inoculated into which were then incubated in a photophore under microaerophilic conditions at 37°C for 48–72 h. After that, cultures were cooled for a few minutes in ice water upright to remove the attached trophozoites from the tube walls. In addition, we took 0.05 µl of the liquid part from the tube bottom, mixed it with 0.05 µl PBS and examined it to search for trophozoite stages of different parasites. All positive cultures were maintained by sub-culturing every three days.

In vitro evaluation of the heterocyclic ingredient effect in culture media. Certain weights of the heterocyclic compound were dissolved in Locke solution to obtain the desired concentrations of 0.25; 0.5; 0.75; and 1.0 µg/ml. For each concentration, three tubes of culture media were supplemented with inactivated human serum, antibiotics, and starch. Transplantation with about 5000 trophozoites of *E. histolytica* was carried out after counting utilizing a hemocytometer. The im-

planted tubes were incubated as described in the abovementioned steps. The viability of the trophozoites was estimated after 24, 48, and 72 hours of exposure by counting the viable and nonviable cells in 30–50 microscopic fields using 0.4% trypan blue [26]. The percentage of viable cells (no. of viable cells/total viable and unviable cells ×100) and inhibition rate (control group — treated group/control group × 100) of each concentration were calculated. Metronidazole at a concentration of 0.8 μg/ml and cultures without any addition were tested as negative and positive controls. Each experiment was conducted in triplicate.

In vitro evaluation of the heterocyclic ingredient on E. histolytica and G. lamblia cysts. The test of evaluation of compound effects on the different parasite species was carried out using the [11] method with some modifications. First, we dissolved 1 ml $C_{15}H_{12}N_5OCL$ (0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 mg/ml) in PBS, and then incubated it with about 1000 cysts of *E. histolytica* and *G. lamblia*, which had been isolated as described in the previous step. After incubation for 10, 20, and 40 minutes, the cysts were washed three times with PBS. Then 0.1 ml of trypan blue was mixed with 0.1 ml of cyst sediment for 15 minutes. The viable and unviable cysts were counted in 30–50 microscopic fields. The percentage of viable cysts (No. of viable cells/total viable and unviable cells × 100) and inhibition rate (control group — treated group/control group × 100) was calculated. An incubation with metronidazole 0.8 mg/ml and PBS were used as controls. Each experiment was carried out in triplicate.

Toxicological effect of the heterocyclic compounds

To test the toxicity of our compound in our study we proceeded to sacrifice the mice that received different concentrations (the highest and the lowest doses) of our compound ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) and metronidazole to obtain blood and serum samples. Blood samples were collected in EDTA and dry tubes and used to measure some hematological parameters such as red and white blood cells and platelets. For analysis, about 500 μl of blood was added to the CBC apparatus type Swelab (Swedish made) for analysis and we printed all the results for each realized test. On the other hand, serum was used to evaluate the effect of the compounds on liver and kidney function (GPT, GOT, alkaline phosphatase, urea, and creatinine) were measured. Thus, with the help of the Cobas type chemistry analyzer (German made), we used 150 μl of serum to test the liver and kidney function and all the test results were printed and analyzed. To finish with this aspect of our study, we took the blood samples from infected mice untreated with any substance and uninfected mice for comparison as control groups.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software. The comparative analysis between concentrations obtained and the value of controls was done, as well as between concentrations and times of treatment, and between concentrations and controls for blood analysis tests and other chemical tests. Analysis of variance between studied factors was done using an ANOVA two-factor test without replication. Differences were considered statistically significant at a 0.05 confidence level.

Results

Pharmaceutical activity of the heterocyclic ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) compound

In vivo pharmaceutical activity of the heterocyclic compound. After examination, we observed a direct relationship between the substance and *Giardia* at different concentrations and times. The use of this compound led to a complete recovery after five days. The results obtained with metronidazole were similar to those obtained with the synthetic compound, especially at the concentration of 1 mg/kg, and an inhibition of 88.2% after four days. The effect of the substance on the dying stages was evident in the deposition of the substance around their nuclei, which gave it a very visible and prominent appearance (Fig. 2, A).

In vitro evaluation of the heterocyclic ingredient effect in culture media. The effect of the synthetic substance on *Entamoeba* in the culture was great and was close to the effect of metronidazole, and the effect remained almost constant on the second and third days. The maximum effect was at a concentration of 1 μg /ml after 72 hours, with an inhibition rate of 89.4% compared with the effect of metronidazole, which reached 94.7 percent after the same period (Fig. 2, B).

In vitro evaluation of the heterocyclic compound on E. histolytica and G. lamblia cysts. The cystic stage was more resistant to the effect of the synthetic compound for both parasites, although the effect of the compound exceeded that of metronidazole, especially at the highest concentration and during the forty minutes of incubation. The effect of the compound was greater than metronidazole. Indeed, we obtained a percentage of inhibition and death of 46.7% for *Entamoeba* cysts and 20.4% for *Giardia* cysts with the synthetic compound, while the inhibition rate with metronidazole was 10% and 13.3%, respectively for *Entamoeba* and *Giardia* (Fig. 2, C, D). We also observed that the effect of the substance on the dead cystic stages was evident in the deposition of the substance around the nuclei of the cystic stages and the cyst wall, which gave it a very visible and prominent appearance, especially for the cystic stages of the *Entamoeba* parasite.

Toxicological effect of the heterocyclic ($C_{15}H_{12}N_5OCL$) compound

Concerning the toxicity of the heterocyclic compound, our analyses revealed that the substance had no significant effect on the different parameters evaluated (blood, number of red blood cells) compared to the

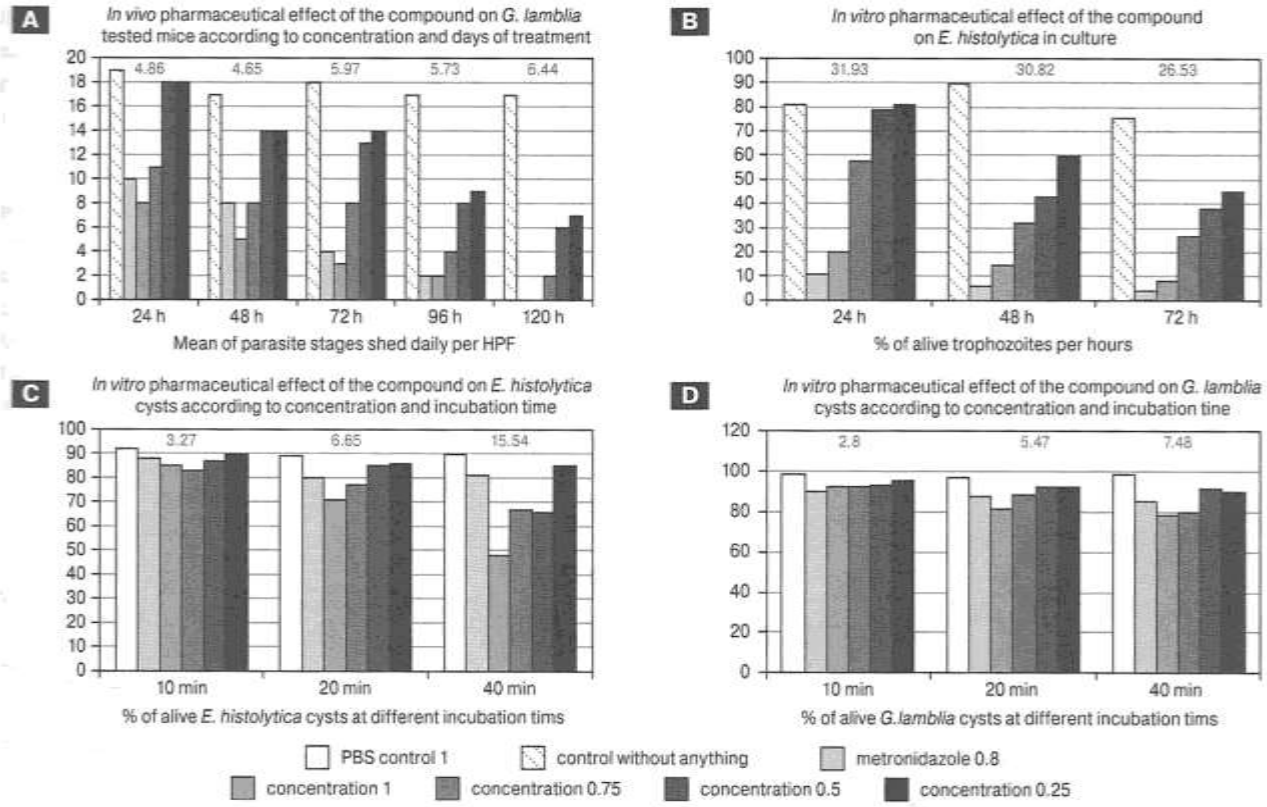


Figure 2. *In vivo* and *in vitro* pharmaceutical effect of the heterocyclic compound on tested parasites, the numbers marked above in gray indicate the standard deviations

control groups. Thus, no parameters gave significant differences between them and the controls (Fig. 3, A).

The groups of mice infected and treated with the substance and metronidazole showed only a slight increase in white blood cells compared to the uninfected and untreated control groups (Fig. 3, B, C). However, both products (synthetic substance and metronidazole) had only a slight effect on the platelet count. We observed a significant increase compared to the control groups (Fig. 3, D, E, F). On the other hand, our results show that when the effects of the manufactured substance were tested on some liver and kidney functions, the effect of the substance was not significant on any of the studied parameters except for the GOT enzyme, where the ratio of the enzyme in mice dosed with the substance and metronidazole had slightly increased compared to the uninfected and untreated control group (Fig. 3, G, H, I).

Discussion

For the first time, the current study sought to assess the effectiveness of a novel synthetic organic compound against two kinds of intestinal parasites. Indeed, intestinal protozoa are one of the main causes of gastrointestinal diarrhea, responsible for many cases of morbidity and death [9]. And metronidazole is the only treatment used and available in many developing countries against its parasitic infections. However, many attempts to find alternative treatments to treat many intestinal parasites, especially those with a deleterious effect on human health [3, 5]. Indeed, in many cases, it may be necessary to manufacture the effective active ingredient, even when extracted from plants, in order to overcome the obstacles inherent in traditional methods [27].

The manufactured materials are pure and the quantities obtained from them are abundant, but their toxicological and histological effects need to be studied if they are used for therapeutic purposes [31]. In our case, the use of this substance was based on proving its lethal effects on pathogenic resistant bacteria [1].

In this study, the results show that the tested substance had an effect on parasites of the genus Giardia. Indeed, a direct effect was found between this compound and this parasite at different concentrations over time. This led to a complete recovery after five days of treatment with our compound. This result is similar to the one observed with metronidazole [28], especially at a concentration of 1 mg/kg. Also, this compound had a similar effect to metronidazole on *Entamoeba* cultures [15]. Thus, we believe this compound could be an excellent therapeutic alternative for the treatment of intestinal parasites. However, we observed that the cystic stage of both parasites was more resistant to our compound, although the impact of our substance exceeded that of metronidazole [28], especially at the highest concentration. This effect on trophozoites may be because organic compounds are made of heterocyclic ring systems that

have a wide range of biological activities, effective against many pathogens [4, 18, 33]. Thus, we believe that the compound tested here in our study would exhibit the same effects as those of many drugs and that certain compounds that produce anions that would be toxic to trophozoites would potentially activate it [33]. This would lead to DNA breakage and destabilization of helices, resulting in the inhibition of synthesis of certain proteins, which may kill the parasite [4, 18, 24, 33]. The reduced efficacy observed on the cystic stage, on the other hand, could be explained by the fact that cysts are surrounded by a protective wall that is resistant to many substances [17], making penetration of the substance more difficult. Thus, we believe that increasing the period of exposure of the cysts to the substance would increase the effect of this product on the parasites and thus allow the destruction of a greater proportion, especially since the material had a good effect on the cysts.

Concerning the toxicity, the compound did not present any toxic effect on the different blood parameters evaluated, i.e., on the number of red and white blood cells and platelets. Also, on some functions and enzymes of the kidneys and liver of mice treated with our compound. Previous studies on the impact of synthetic chemicals on intestinal parasites have

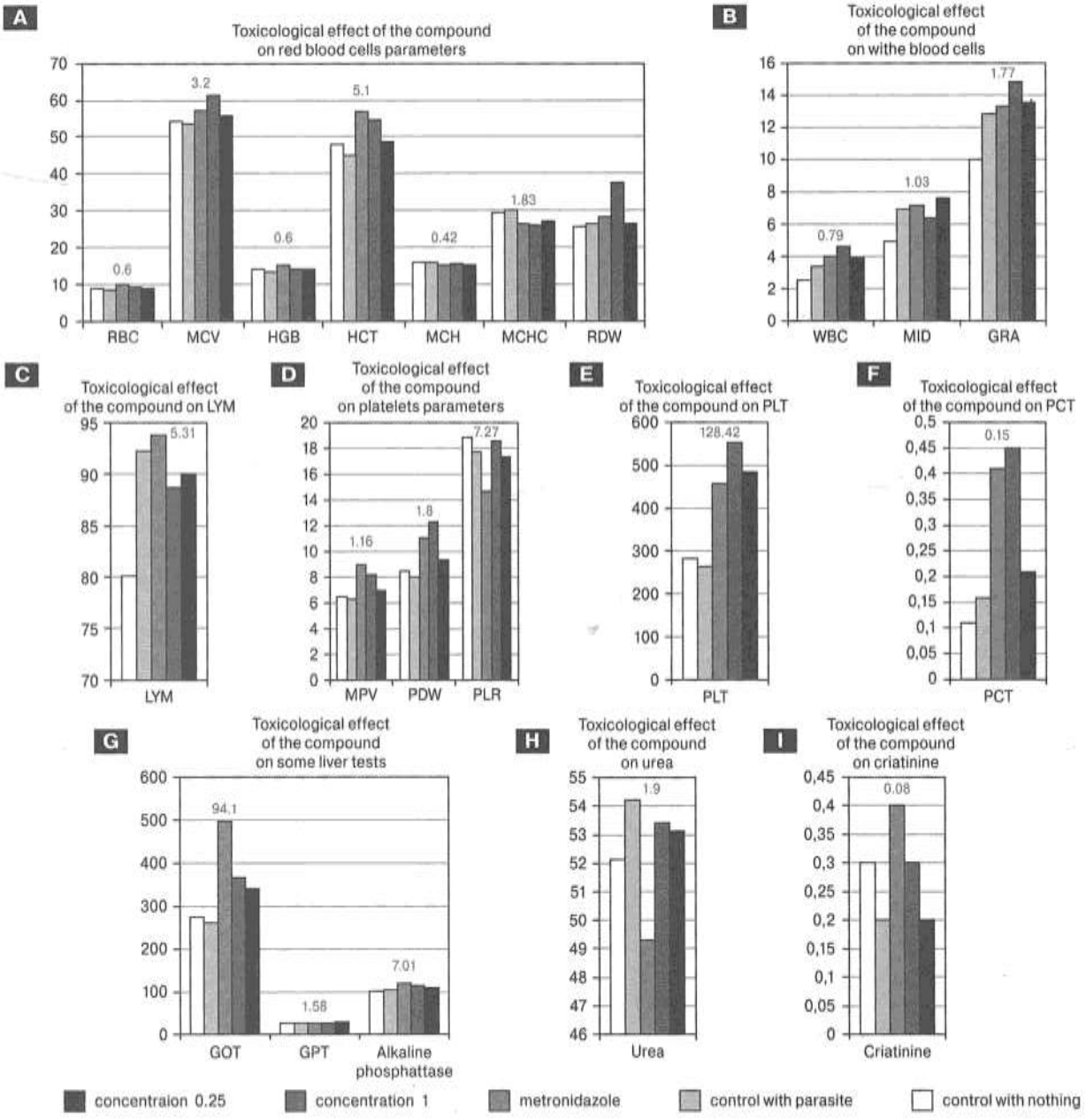


Figure 3. Toxicological effect tests of the compound on some blood, liver and kidney tests

Notes. HGB — hemoglobin, HCT — hemotocrit, RDW — red cell distribution width, MCV — mean corpuscular volume, MCH — mean corpuscular hemoglobin, MCHC — mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT — platelet, MPV — mean platelet volume, PDW — platelet distribution width, MID — mid-range absolute count (mono., eosino., baso.), PCT — plateletcrit, PLR — larger platelet cell ratio, the numbers marked above in gray indicate the standard deviations.

taken many different forms. For instance, cryptdin-2 was investigated for its impact on *E. histolytica* and found to be highly effective at lower concentrations [26]. Similar tests were done on the effectiveness of hexadecyl-PC and other compounds with longer alkyl chains against two other strains of *E. histolytica*. However, of all the substances examined in earlier investigations, oleyl-PC, octadecyl-PC, and nonadecenyl-PC were the most successful [29].

Additionally, the anti-protozoal kaempferol (KPF) *in vitro* test results for *E. histolytica* and *G. lamblia* were 7.9 g/mL and 8.7 g/mL, respectively, with a 50% effective concentration [7]. Similar to this, KPF use resulted in early cell death by causing the absence of some intracellular regions of cytoplasmic juice [2]. When tested against *E. histolytica* and *G. intestinalis*, the synthetic substance 5-(3-chlorophenyl)-1-methyl-4-nitro-1H-imidazole demonstrated a high fatal dosage of 1.47 μM/mL [27]. Additional synthetic inhibitors were discovered to show potential chemotherapeutic activities comparable to metronidazole against trophozoites and/or cysts of *G. intestinalis* and *E. histolytica* [8, 15, 28].

Conclusion

In the end, we concluded that this substance is highly effective against both *Entamoeba* and *Giardia*, and its effectiveness may exceed that of metronidazole at low concentrations. In addition to the stability of the substance and resistance to change, the substance did not have any toxic effects on the parameters that were studied. Therefore, it could be a promising pharmacophore for parasites and an alternative or competitor to the current medications available. As a result, we recommend using this substance and researching its effects on other pathogens, as it has proven effective against both bacteria and parasites. We also recommend researching its histological and toxic effects on various human and animal organs, as well as researching the substance's mechanisms of action and sites of influence.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank the working staff in the Kirkuk General Pediatric Hospital in Kirkuk city for their assistance and cooperation and for facilitating our work during the period of conducting the research, especially the staff in the consultative laboratory and the emergency laboratory, and we especially mention miss Dena Nail Abdulahadlahad and miss Alaa Abdulla Ali and Mrs. Songul Murdan Mustafa.

References

1. Al-Salihi S., Israa A., Israa A., Fournier J. Biological activity study for some heterocyclic compounds and their impact on the Gram-positive and negative bacteria their impact the Gram-positive and negative bacteria. *Energy Procedia, 2019, vol. 157, pp. 296–306.*
2. Argüello-García R., Calzada F., García-Hernández N., Chávez-Munguía B., Velázquez-Domínguez J.A. Ultrastructural and proapoptotic-like effects of kaempferol in Giardia duodenalis trophozoites and bioinformatics prediction of its potential protein target. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 2020, vol. 115: e200127. doi: 10.1590/0074-02760200127*
3. Azadbakht M., Chabra A., Saeedi Akbarabadi A., Motazedian M.H., Monadi T., Akbari F. Anti-parasitic activity of some medicinal plants essential oils on Giardia lamblia and Entamoeba histolytica, in vitro. *Res. J. Pharmacogn., 2020, vol. 7, no. 1, pp. 41–47. doi: 10.22127/rjp.2019.168142.1462*
4. Barbuceanu S.-F., Saramet G., Almajan G.L., Draghici C., Barbuceanu F., Bancescu G. New heterocyclic compounds from 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole class bearing diphenylsulfone moieties. Synthesis, characterization and antimicrobial activity evaluation. *Eur. J. Med. Chem., 2012, vol. 49, pp. 417–423. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.01.031*
5. Bashyal B., Li L., Bains T., Debnath A., LaBarbera D.V. Larrea tridentata: A novel source for anti-parasitic agents active against Entamoeba histolytica, Giardia lamblia and Naegleria fowleri. *PLoS Negl Trop. Dis., 2017, vol. 11, no. 8: e0005832. doi: 10.1371/journal.pntd.0005832*
6. Bendesky A., Menéndez D., Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res., 2002, vol. 511, iss. 2, pp. 133–144. doi: 10.1016/S1383-5742(02)00007-8*
7. Calzada F., Correa-Basurto J., Barbosa E., Mendez-Luna D., Yepez-Mulia L. Antiprotozoal constituents from Annona cherimola Miller, a plant used in mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea and dysentery. *Pharmacogn. Mag., 2017, vol. 13, no. 49, pp. 148–152. doi: 10.4103/0973-1296.197636*
8. Debnath A., Shahinas D., Bryant C., Hirata K., Miyamoto Y., Hwang G., Gut J., Renslo A.R., Pillai D.R., Eckmann L., Reed S.L., McKerrow J.H. Hsp90 inhibitors as new leads to target parasitic diarrheal diseases. *Antimicrob. Agents Chemother., 2014, vol. 58, no. 7, pp. 4138–4144. doi: 10.1128/AAC.02576-14*
9. Di Genova B.M., Tonelli R.R. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Front. Microbiol., 2016, vol. 7: 256. doi: 10.3389/fmicb.2016.00256*
10. Donohoe C.D., Guidos P.A. MR as a biomarker for metronidazole induced encephalopathy: clinical, neuroimaging and differential diagnostic features. *Int. J. Neurol. Neurother., 2016, vol. 3, iss. 4: 055. doi: 10.23937/2378-3001/3/4/1055*
11. Ehrenkaufer G.M., Suresh S., Solow-Cordero D., Singh U. High-throughput screening of entamoeba identifies compounds which target both life cycle stages and which are effective against metronidazole resistant parasites. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2018, vol. 8: 276. doi: 10.3389/fcimb.2018.00276*

12. Freeman C.D., Klutman N.E., Lamp K.C. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs, 1997, vol. 54, no. 5, pp. 679–708. doi: 10.2165/00003495-199754050-00003*
13. Garcia L.S. Diagnostic medical parasitology: 5th ed. *Washington, DC: ASM Press, 2007. 1202 p.*
14. Gardner T.B., Hill D.R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev., 2001, vol. 14, no. 1, pp. 114–128. doi: 10.1128/CMR.14.1.114-128.2001*
15. Guzmán-Delgado N.E., Carranza-Torres I.E., García-Davis S., Rivera G., Morán-Martínez J., Betancourt-Martínez N.D., Groothuis G.M.M., de Graaf I.A.M., Carranza-Rosales P. Development of a novel ex-vivo 3D model to screen amoebicidal activity on infected tissue. *Sci. Rep., 2019, vol. 9, no. 1: 8396. doi: 10.1038/s41598-019-44899-5*
16. Iyer L.R., Singh N., Verma A.K., Paul J. Differential expression and immunolocalization of antioxidant enzymes in Entamoeba histolytica isolates during metronidazole stress. *Biomed. Res. Int., 2014, vol. 2014: 704937. doi: 10.1155/2014/704937*
17. Jarroll E.L., Sener K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. *Drug Resist. Updat., 2003, vol. 6, no. 5, pp. 239–246. doi: 10.1016/s1368-7646(03)00065-7*
18. Kumar S., Singh R.K., Patial B., Goyal S., Bhardwaj T.R. Recent advances in novel heterocyclic scaffolds for the treatment of drug-resistant malaria. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2016, vol. 31, no. 2, pp. 173–186. doi: 10.3109/14756366.2015.1016513*
19. Lalle M., Hanevik K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infect. Drug Resist., 2018, vol. 11, pp. 1921–1933. doi: 10.2147/IDR.S141468*
20. Laupland K.B., Church D.L. Population-based laboratory surveillance for Giardia sp. and Cryptosporidium sp. infections in a large Canadian health region. *BMC Infect. Dis., 2005, vol. 5: 72. doi: 10.1186/1471-2334-5-72*
21. Lefkowitz A., Shadowitz S. Reversible cerebellar neurotoxicity induced by metronidazole. *CMAJ, 2018, vol. 190, no. 32: E961. doi: 10.1503/cmaj.180231*
22. Li L., Tang X., Li W., Liang S., Zhu Q., Wu M. A case of methylprednisolone treatment for metronidazole-induced encephalopathy. *BMC Neurol., 2019, vol. 19, no. 1: 49. doi: 10.1186/s12883-019-1278-6*
23. Linstead D. Cultivation. In: Trichomonads parasitic in humans; ed. Honigberg B.M. *Springer, New York, NY, 1990, pp. 91–111. doi: 10.1007/978-1-4612-3224-7_7*
24. Livermore D.M. The need for new antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect., 2004, vol. 10, suppl. 4, pp. 1–9. doi: 10.1111/j.1465-0691.2004.1004.x*
25. Petri W.A., Haque R. Entamoeba histolytica brain abscess. *Handb. Clin. Neurol., 2013, vol. 114, pp. 147–152. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00009-1*
26. Preet S., Bharati S., Shukla G., Koul A., Rishi P. Evaluation of amoebicidal potential of Paneth cell cryptdin-2 against Entamoeba histolytica. *PLoS Negl Trop. Dis., 2011, vol. 5, no. 12: e1386. doi: 10.1371/journal.pntd.0001386*
27. Saadeh H.A., Mosleh I.M., El-Abadelah M.M. New synthesis and antiparasitic activity of model 5-aryl-1-methyl-4-nitroimidazoles. *Molecules, 2009, vol. 14, no. 8, pp. 2758–2767. doi: 10.3390/molecules14082758*
28. Saleh S.S., AL-Salihi S.Sh., Mohammed I.A. Biological activity study for some heterocyclic compounds and their impact on the gram positive and negative bacteria. *Energy Procedia, 2019, vol. 157, pp. 296–306. doi: 10.1016/j.egypro.2018.11.194*
29. Seifert K., Duchêne M., Wernsdorfer W.H., Kollaritsch H., Scheiner O., Wiedermann G., Hottkowitz T., Eibl H. Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite Entamoeba histolytica. *Antimicrob. Agents Chemother., 2001, vol. 45, no. 5, pp. 1505–1510. doi: 10.1128/AAC.45.5.1505-1510.2001*
30. Stanley S.L. Jr. Amoebiasis. *Lancet, 2003, vol. 361, no. 9362, pp. 1025–1034. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9*
31. Ullah F., Ayaz M., Sadiq A., Ullah F., Hussain I., Shahid M., Yessimbekov Z., Adhikari-Devkota A., Devkota H.P. Potential role of plant extracts and phytochemicals against foodborne pathogens. *Appl. Sci., 2020, vol. 10: 4597. doi: 10.3390/app10134597*
32. Victoria-Hernández J.A., Ventura-Saucedo A., López-Morones A., Martínez-Hernández S.L., Medina-Rosales M.N., Muñoz-Ortega M., Ávila-Blanco M.E., Cervantes-García D., Barba-Gallardo L.F., Ventura-Juárez J. Case report: multiple and atypical amoebic cerebral abscesses resistant to treatment. *BMC Infect. Dis., 2020, vol. 20, no. 1: 669. doi: 10.1186/s12879-020-05391-y*
33. Weir C.B., Le J.K. Metronidazole. In: StatPearls [Internet]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.*
34. Zavala-Ocampo L.M., Aguirre-Hernández E., Pérez-Hernández N., Rivera G., Marchat L.A., Ramírez-Moreno E. Antiamoebic activity of Petiveria alliacea leaves and their main component, Isoarborinol. *J. Microbiol. Biotechnol., 2017, vol. 27, no. 8, pp. 1401–1408. doi: 10.4014/jmb.1705.05003*

Авторы:
Обейд Х.М., ассистент кафедры медицинских лабораторных технологий Колледжа здравоохранения и медицинских технологий Северного технического университета, г. Киркук, Ирак;
Сале С.С., профессор факультета химии Киркукского научного колледжа, г. Киркук, Ирак;
Бунденга Л., руководитель отдела паразитологии (подразделения паразитов дикой природы и «забытых» паразитозов) Группы эволюции и межвидовой передачи патогенов Международного центра медицинских исследований Франсвиля, г. Франсвиль, Габон; кафедра антропологии Даремского университета, г. Дарем, Великобритания.

Authors:
Obaid H.M., Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Techniques, College of Health and Medical Techniques, Northern Technical University, Kirkuk, Iraq;
Sale S.S., Professor, Department of Chemistry, College of Science, Kirkuk University, Kirkuk, Iraq;
Boundenga L., Head of Parasitology Department (Unit of Wildlife Parasites and Neglected Parasitoses), Group of Evolution and Interspecies Transmission of Pathogens, International Centre for Medical Research of Franceville, Franceville, Gabon; Department of Athropology, Durham University, Durham, United Kingdom.

Поступила в редакцию 06.09.2022
Отправлена на доработку 29.11.2022
Принята к печати 25.12.2022

Received 06.09.2022
Revision received 29.11.2022
Accepted 25.12.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 127–132

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 127–132

CLINICAL CHARACTERISTICS AND LABORATORY TEST IN FULL-TERM NEONATES WITH SEPSIS IN VIETNAM NATIONAL CHILDREN'S HOSPITAL (NORTHERN VIETNAM)

T.B. Nguyen[a,b], T.N.T. Nguyen[a], T.H. Dang[a], B.N. Nguyen[a], T.M.H. Truong[a], T.H. Le[a], N.D. Le[a]

[a] *Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam*
[b] *Hanoi Medical University, Hanoi City, Vietnam*

Abstract. *Background.* Sepsis is a life-threatening condition in response to an infectious agent, causing damage to organs. Sepsis causes serious consequences in neonates due to high rates of mortality, sequelae, and disability. The Southeast Asian country of Vietnam features on of the highest infectious disease rates in the world (high rates of infection, disability and mortality), as well as being a middle-income country with a stratified health care system. The aim of this study was to evaluate the clinical and laboratory characteristics of patients at the Vietnam National Children's Hospital. *Materials and methods.* This descriptive study was conducted with 85 full-term infants with sepsis admitted to Vietnam National Children's Hospital in the period from December 2019 to April 2021. Patients had at least 2 clinical symptoms and 2 laboratory signs according to the criteria for assessment of neonatal sepsis (European Medicines Agency in 2010) along with positive blood culture results. *Results.* Common clinical symptoms in neonates with sepsis included poor feeding (89.4%), respiratory failure (69.4%), fever (51.8%), tachycardia (52.8%), and shock (25%). Anemic patients accounted for many (72.9%). Patients with increased white blood counts accounted for 41.2%. Newborns with a low white blood count accounted for 15.4%. Patients with thrombocytopenia were 49.6%. Most patients had elevated CRP (88.3%). The mean value of nCD64 was 10167.1±6136.9 molecules bound/cell. mHLA-DR was 9898.4±14173.9 molecules bound/cell. The Sepsis Index was 274.6±287.5. *Conclusions.* We recorded differences in clinical characteristics and laboratory tests in full-term neonates with sepsis at National Children's Hospital, of which, nCD64, mHLA-DR, and Sepsis Index should be further investigated and referred to as prospective routine biomarkers in diagnosis of neonatal sepsis.

Key words: *neonatal sepsis, nCD64, mHLA-DR, sepsis index, clinical symptoms, laboratory signs.*

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С СЕПСИСОМ ВО ВЬЕТНАМСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОЙ ДЕТСКОЙ БОЛЬНИЦЕ (СЕВЕРНЫЙ ВЬЕТНАМ)

Нгуен Т.Б.[1,2], Нгуен Т.Н.Т.[1], Данг Т.Х.[1], Нгуен Б.Н.[1], Чыонг Т.М.Х.[1], Ле Т.Х.[1], Ле Н.Д.[1]

[1] *Вьетнамская национальная детская больница, Ханой, Вьетнам*
[2] *Ханойский медицинский университет, Ханой, Вьетнам*

Резюме. *Актуальность.* Сепсис — опасное для жизни состояние, развивающееся в ответ на инфекционный агент и вызывающее полиорганное поражение. Сепсис у новорожденных часто имеет тяжелые последствия, приводя к инвалидности, а нередко и к летальному исходу . Вьетнам, страна Юго-Восточной Азии, отличается

Адрес для переписки:
Ле Нгок Дюи
18/879 La Thanh, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi,
Вьетнамская национальная детская больница.
Тел.: (84-024) 6 273 8532.
E-mail: Drduy2411@gmail.com

Contacts:
Le Ngoc Duy
18/879 La Thanh, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi,
Vietnam National Children's Hospital.
Phone: (84-024) 6 273 8532.
E-mail: Drduy2411@gmail.com

Для цитирования:
Нгуен Т.Б., Нгуен Т.Н.Т., Данг Т.Х., Нгуен Б.Н., Чыонг Т.М.Х., Ле Т.Х., Ле Н.Д. Клиническая характеристика и лабораторные исследования у доношенных новорожденных с сепсисом во Вьетнамской национальной детской больнице (Северный Вьетнам) // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 127–132. doi: 10.15789/2220-7619-CCA-1861

Citation:
Nguyen T.B., Nguyen T.N.T., Dang T.H., Nguyen B.N., Truong T.M.H., Le T.H., Le N.D. Clinical characteristics and laboratory test in full-term neonates with sepsis in Vietnam national children's hospital (Northern Vietnam) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 127–132. doi: 10.15789/2220-7619-CCA-1861

© Nguyen T.B. et al., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CCA-1861

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

одним из самых высоких показателей инфекционных заболеваний в мире (высокий уровень инфицирования, инвалидности и смертности), а также является страной со средним уровнем дохода и стратифицированной системой здравоохранения. Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить клинико-лабораторные характеристики пациентов с сепсисом во Вьетнамской национальной детской больнице. *Материалы и методы.* Описательное исследование было проведено с участием 85 доношенных новорожденных с сепсисом, поступивших во Вьетнамскую национальную детскую больницу в период с декабря 2019 г. по апрель 2021 г., имевших не менее 2 клинических симптомов и 2 лабораторных признаков в соответствии с критериями оценки неонатального сепсиса (Европейское агентство по лекарственным средствам, 2010 г.) в сочетании с положительными результатами посева крови. *Результаты.* Общие клинические симптомы у новорожденных с сепсисом включали вялое сосание (89,4%), дыхательную недостаточность (69,4%), лихорадку (51,8%), тахикардию (52,8%) и шок (25%). Преобладали больные с анемией (72,9%). Больные с повышенным содержанием лейкоцитов составили 41,2%, с пониженным содержанием лейкоцитов — 15,4%, с тромбоцитопенией — 49,6%. У большинства пациентов был повышен СРБ (88,3%). Среднее значение nCD64 составило 10167,1±6136,9 связанных молекул/клетку, mHLA-DR — 9898,4±14173,9 связанных молекул/клетку. Индекс сепсиса составил 274,6±287,5. *Выводы.* Нами обнаружены различия в клинических характеристиках и лабораторных показателях у доношенных новорожденных с сепсисом в Национальной детской больнице. Следует дополнительно исследовать показатели nCD64, mHLA-DR и индекс сепсиса, которые можно рассматривать как возможные рутинные биомаркеры в диагностике неонатального сепсиса.

Ключевые слова: *неонатальный сепсис, nCD64, mHLA-DR, индекс сепсиса, клинические симптомы, лабораторные признаки.*

Introduction

According to a report by the World Health Organization (WHO), in 2019 globally, there were 2.4 million infant deaths, of which neonatal sepsis is one of the leading causes [26]. Surveys conducted worldwide in the period 1990–2017 estimated there were more than 25 million cases of sepsis, mainly neonates [22]. Another study in 13 countries and territories from 1979 to 2019 also showed that the infant mortality rate was 17.6%, being higher in low- and middle-income countries [27]. Sepsis is a life-threatening condition in response to an infectious agent, causing damage to tissues and organs. Sepsis causes serious consequences in neonates due to high rates of mortality, sequelae, and disability [17, 27]. Vietnam is a country in Southeast Asia featuring some of the highest infectious disease rates in the world, including high rates of infection, disability, and mortality [22]. This prospective study aimed to evaluate the clinical and laboratory characteristics of patients at the Vietnam National Children'sHospital to show the clearest and most complete picture of full-term neonatal sepsisin NorthernVietnam.

Materials and methods

Patients. A descriptive study was conducted of 85 full-term infants admitted to the Neonatal Center of Vietnam National Children's Hospital in the period from 12/2019 to 4/2021.

Selection criteria: term newborns with at least 2 clinical symptoms and 2 laboratory signs according to the criteria for assessment of neonatal sepsis of the European Medicines Agency in 2010 (EMA 2010) [21] along with positive blood culture results.

Exclusion criteria: major congenital anomaly, inborn errors of metabolism, neonates who have received blood transfusion.

Laboratory tests. On the first day of admission, blood samples were taken for complete analysis of blood cells, blood gases, liver and kidney function, blood sugar, C-reactive protein, and blood culture by routine laboratory tests. Neutrophil CD64 (nCD64) and monocyte HLA-DR (mHLA-DR) expression were evaluated by flow cytometry (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) using a phycoerythrin (PE) fluorescence quantification kit (QuantiBRITE PE, Becton Dickinson) and calculated into phycoerythrin molecules bound/cell. Sepsis Index (SI) was calculated from nCD64 and mHLA-DR values.

Statistical analysis. Results were analyzed with SPSS 20.0 statistical software (SPSS Inc, IL). The level of significance considered was 0.05. According to EMA 2010 criteria, we chosecut-offvalues for CRP, WBC and PLT of 15 mg/L, 20 000/mm^3 and 100 000/mm^3, respectively.

Ethics statement. Conduct of the study was approved by the Medical Research Ethics Committee at the Vietnam National Children's Hospital according to Decision No. 332 (dated March 10, 2020).

Results

In theperiod from December 2019 to April 2021 at the Neonatal Center in Vietnam National Children's Hospital, 85 patients with positive blood culture results met the research criteria. Among them, 39 were girls (45.9%), and 46 were boys (54.1%). Other features were:average gestational age 38.6±1.1 weeks; average weight 2918.2±548 grams; and age average hospital admission 10.4±8.2 days.

Most of the children received frontline treatment 78/85 (91.8%). The majority of children received frontline antibiotics 73/85 (85.9%) and frontline mechanical ventilation. Other characteristics were: 31/85 (36.5%) children had central catheters; 43/85

children were born by caesarean section; and 9/85 mothers had fever around delivery. Time of onset of infection: 52/85 children had early onset of infection (≤ 7 days); 33/85 children had late onset of infection (> 7 days).

Discussion

Currently, the trend of early neonatal sepsis is decreasing, and the rate of late neonatal sepsis is increasing. A. van den Hoogen tracked data from 1978–2006. The rate of early sepsis decreased from 52.1% to 28.1%. In contrast, the rate of late sepsis increased from 11.4% to 13.9% [25]. This may be due to better management of pregnancy, the mother are vaccinated against Group B streptococcus avoid infecting the baby, ormaternalinfections are better managed.

The rate of children with fever accounted for 51.8%. Our results are similar to the results of A Sorsa in Ethiopia with the rate of 47.5% of full-term infants with sepsis having fever, but higher than the rate of 23.9% of infants with febrile illness in J. Davis's study [3, 23]. The rate of febrile children with severe infections (septicemia, meningitis, etc.) ranged from 6.3% to 28% [8].

Our rate of children with hypoxemia was higher than that of A. Sorsa (34%) [23]. In our study, 21.2% of children with rales showed damage due to bronchopneumonia or pneumonia, so many children had rapid breathing.

Tachycardia is the most common symptom (51.8%), especially in $^1/_3$ children with septic shock and capillary refill times > 3 seconds. Tachycardia is a common finding in neonatal sepsis, but is not specific. In our study, many children's fever may be the cause affecting the rate of tachycardia. Poor perfusion and hypotension are often detected late. The rate of these two symptoms in our study was 25/85 (29.4%), equivalent to the research results of B.J. Stoll [24].

Poor feeding was the most common digestive symptom, accounting for 92.9%. Abdominal distention and diarrhea accounted for 43.5% and 2.4%. The study of M.S. Edwards showed that gastrointestinal symptoms presented with the rates of: jaundice 35%, hepatomegaly 33%, poor appetite 28%, vomiting 25%, abdominal distention 17%, and diarrhea 11% [6].

Table 1. Clinical characteristics of the study group (n = 85)

Parameter	Number	Percentage
Rapid breathing	30	35.3
Apnea > 20 seconds	4	4.7
SpO_2 < 85%	64	75.3
Rales	18	21.2
Tachycardia	44	51.8
Shock	24	29.4
Refill > 3 seconds	25	29.4
Mottled skin	19	22.4
Oliguria	15	17.6
Hypotension	13	15.3
Poor sucking	79	92.9
Delayed gastric emptying	60	70.6
Abdomen distention	37	43.5
Diarrhea	2	2.4
Lethargy	25	29.4
Seizures	2	2.4
Hypertonic	2	2.4
Hypotonic	1	1.2
Scleroderma	17	20.0
Petechiae	15	17.6
Jaundice	10	11.8
Abscess	3	3.5
Boil	3	3.5
Skin necrosis	2	2.4
Rash	2	2.4
Purulent dermatitis	1	1.2

Neurological symptoms in our study were mainly lethargy. In V. Anand's study, 38% of neonates with sepsis had seizures [1]. L. Pugni, evaluating a group of neonates with severe sepsis, showed common neurological symptoms including 56% hypotonicity, 56% lethargy, and 3.9% seizures [19].

The mean Hct of the study group was 40.3±7.3%, and 72.9% of children were anemic. Our rate of children with anemia is lower than that of N. Cai (84.9%) [2]. Anemia is one of the common conditions in neonatal sepsis.

Table 2. Peripheral blood count and CRP (n = 85)

Parameter	X±SD	Increase (n, %)	Decrease (n, %)	Normal (n, %)
White blood cell, x 10^9 cells/L	16.78±10.31 (2.15–54.98)	35 (41.2)	13 (15.4)	37 (43.5)
Platelet, x 10^9 cells/L	21.17±20.44 (4–77.3)	0	42 (49.6)	43 (50.4)
Hct, %	40.3±7.3	23 (27.1)	62 (72.9)	0
CRP, mg/L	84.2±76.8	75 (88.3)	0	10 (11.7)

Table 3. Coagulation (n = 80)

	X±SD	Increased (n, %)	Reduced (n, %)	Normal (n, %)
Prothrombin, %	65.5±26.2	0 (0.0)	48 (60)	32 (40)
APTT, second	47.5±23.3	46 (57.2)		34 (42.8)
Fib, second	3.5±1.5	40 (50)		40 (50)

Table 4. Blood biochemical index (n = 85)

	X±SD (mmol/L)	Increased (n, %)	Reduced (n, %)	Normal (n, %)
Na^+	134.3±5.2	5 (4.6)	42 (50.1)	38 (45.3)
K^+	4.6±1.4	33 (38.2)	8 (9.5)	44 (52.3)
Glucose	5.6±5.1	20 (23.6)	2 (2.3)	63 (74.1)
GOT	511.7±185.3	39 (45.2)		46 (54.8)
GPT	272.2±89.6	18 (20.6)		67 (79.4)
Urea	29.5±5.1	18 (20.6)		67 (79.4)
Creatinin	76.7±42.8	25 (28.8)		60 (71.2)
Albumin	7.9±6.6	50 (58.8)		35 (41.2)

Table 5. Blood gas indices (n = 51)

	X±SD (mmol/L)	Increased (n, %)	Reduced (n, %)	Normal (n, %)
pH	7.4±1.24	1 (2.0)	35 (68.6)	15 (29.4)
BE	−6.8±8.1		24 (74.1)	27 (25.9)
Lactate	5.1±3.7	46 (90.1)		5 (9.9)

Our study showed 41.2% of children with increased white blood cells (> 20×10^9 cells/L) and 15.4% of children with reduced white blood cells (< 4×10^9 cells/L). Newman and Hornik showed that low white blood cell counts were more strongly associated with early sepsis in premature infants than in term infants, especially after 4 hours of age. The author also found that white blood cell counts have diagnostic value in early-onset sepsis rather than late-onset [10, 15].

Platelet values in our results were higher than in the study of I.M.C. Ree. The proportion of children with platelets < 150×10^9 cells/L accounted for 49%. Platelet reduction < 100×10^9 cells/L accounted for 39%. The rate of platelets < 150×10^9/L in neonatal sepsis due to Gram-negative bacteria was 69%. For Gram-positive bacteria it was 47% [20].

The average CRP concentration was 84.2± 76.8 mg/L. Most patients had CRP increased above 15 mg/L (88.3%). The study of A. Sorsa showed that CRP > 20 mg/L increased the risk of sepsis by 5.7-fold compared with the group with negative blood cultures [23]. However, J.R. Delanghe suggested that CRP has low sensitivity to detect early-onset sepsis due to the physiological increase in CRP in 3 days postpartum [4]. Elevated CRP may also be caused by non-infectious inflammatory processes, such as meconium aspiration. Therefore, CRP should be combined with other indices (such as nCD64, IL-6 or IL-8) to increase diagnostic value.

In our study, 60% of children had low prothrombin. Coagulation disorder is a serious and common complication in neonatal sepsis. We had a low rate of children with severe electrolyte disturbances (Na^+ < 125 mmol/L, K^+ > 14.2 mmol/L). These were cases of septic shock and death. Research by M.S. Ahmad on a group of neonates with septic shock showed that the rate of children with electrolyte disorders was up to 75.5%; hyperkalemia was the most common electrolyte disorder (39%). The author also showed a strong association between electrolyte disturbances and mortality in children, wherein all children who died had electrolyte disturbances [4].

Table 6. nCD64, mHLA-DR, and Sepsis Index (n = 85)

Index	X±SD
nCD64 (ABC)	10 167.1±6136.9 (1198–32 965)
mHLA-DR (ABC)	9898.4±14 173.9 (434–96 881)
Sepsis Index	274.6±287.5 (18.7–1376.8)

Note. ABC — aantibody-phycoerythrin molecules bound/cell.

We also encountered a low rate of children with renal failure with urea > 200 mmol/L and liver damage with GOT > 2000 UI/L. The study of N.B. Mathur showed that the rate of acute renal failure in neonate with septicemia was 6,5%, and the mortality rate of acute renal failure was 30.7% [12].

Most children had mild metabolic acidosis, but the range was also very wide with: pH = 7.24±1.24 (6.91–7.46) and BE = −6.8±8.1 mEq/L (−22–15). Children with severe metabolic acidosis (pH < 7) and disturbances in major blood gas indices (lactate > 15) are children with unrecoverable septic shock. Blood gas abnormalities are common in neonates treated in the neonatal intensive care unit and are associated with increased mortality. The study by M. Mohammad Yusuf showed that: the mortality group had a lower blood pH (7.3±0.19) than the alive group (7.36±0.1); and the BE of the mortality group was lower (−10.74±15.89 mmol/L) than the live group (−4.3±6.88 mmol/L) [14].

nCD64 had an average value of 10167.1 molecules bound/cell in our study. N. Efe Iris studied adult patients and showed that the sepsis group had an average nCD64 index of 8006 molecules bound/cell, significantly higher than the control group (average nCD64 of 2786 molecules bound/cell). The cut-off value of nCD64 of 2500 molecules bound/cell is considered to have diagnostic value for sepsis in adults, with a sensitivity of 94.1% [7]. P.C. Ng's study showed that the value of nCD64 was not high. The averages in the neonate infected group at the 1st and 24th hour were: 8320 molecules bound/cell and 9704 molecules bound/cell, respectively. These werehigher

than the non-infected group for the1sthour and 24th hour: 3915 molecules bound/celland 4491 molecules bound/cell, respectively.

In the control group (healthy children), nCD64 had an average value of 3426 molecules bound/cell [16]. The nCD64 valuesin premature infants were also very different in the sepsis group, non-sepsis group, and healthy children in J. Du's study. The sepsis group had an average nCD64 of 2869.67 molecules bound/cell, while the healthy group of children had an average of 1610.80 molecules bound/cell ($p = 0.0001$) [5].

mHAL-DR had an average value of 9898.4 molecules bound/cell, equivalent to 32.4% of the value of healthy children. In the study of T.F. Manzoli, areduction in mHLA-DR (< 30% compared with the control group) was a predictor of mortality in the first week of admission [11]. C. Meisel showed that all patients with severe sepsis had mHLA-DR < 8000 molecules bound/cell [13]. S. Tamulyte's study determined that mHLA-DR thresholds (≤ 8000/≤ 5000/≤ 2000 molecules bound/cell) are levels that predict the severity of the patient's condition independent of disease etiology. mHLA-DR values of 2000 molecules bound/cell and 5000 molecules bound/cell were predictive of: longer stay in the intensive care unit; duration of mechanical ventilation and antibiotic therapy; as well as higher microbiological pathogen concentrations.

In our study, the sepsis index (SI) had an average value of 274.6±287.5 (18.7–1376.8). S. Goswami's study of nCD64 and mHLA-DR by mean fluorescence concentration (MFI) also showed that nCD64 was significantly increased in the sepsis group compared with the healthy group ($p < 0.05$), but mHLA-DR was decreased. We found significant difference in the sepsis group and the non-infectious group [9]. The mean value of SI in the group of adult patients with trauma of Ngoc Thao was 112.95 (46.16–270.66). Our results are higher because our patients are full-term infants [18].

Conclusion

In summary, we found that common clinical symptoms in neonates with sepsis included poor feeding (89.4%), respiratory failure (69.4%), fever (51.8%), tachycardia (52.8%), shock (25%), and anemic (72.9%). Increased white blood count accounted for 41.2%; low white blood count accounted for 15.4%. In patients, 49.6% had thrombocytopenia. Most patients had elevated CRP (88.3%). The mean value of nCD64 was 10 167.1±6136.9 molecules bound/cell. mHLA-DR was 9898.4±14 173.9 molecules bound/cell. Sepsis Index was 274.6±287.5.

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the DM Tran Thi Hong Ha who supported apart of this study. We also thank our colleagues at Vietnam National Children's Hospital for collaboration and assistance.

References

1. Anand V., Nair P.M. Neonatal seizures: predictors of adverse outcome. *J. Pediatr. Neurosci., 2014, vol. 9, no. 2, pp. 97–99. doi: 10.4103/1817-1745.139261*
2. Cai N., Fan W., Tao M., Liao W. A significant decrease in hemoglobin concentrations may predict occurrence of necrotizing enterocolitis in preterm infants with late-onset sepsis. *J. Int. Med. Res., 2020, vol. 48, no. 9: 300060520952275. doi: 10.1177/0300060520952275*
3. Davis J., Lehman E. Fever characteristics and risk of serious bacterial infection in febrile infants. *J. Emerg. Med., 2019, vol. 57, no. 3, pp. 306–313. doi: 10.1016/j.jemermed.2019.06.028*
4. Delanghe J.R., Speeckaert M.M. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin. Chim. Acta, 2015, vol. 451, pt A, pp. 46–64. doi: 10.1016/j.cca.2015.01.031*
5. Du J., Li L., Dou Y., Li P., Chen R., Liu H. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PLoS One, 2014, vol. 9, no. 7: e102647. doi: 10.1371/journal.pone.0102647*
6. Edwards M.S., Kaplan S.L., Garcia-Prats J.A. Clinical features and diagnosis of sepsis in term and late preterm infants. In: Basow D.S. (ed.), UpToDate. UpToDate, Waltham, MA. *URL: http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-sepsis-in-term-and-late-preterm-infants?source=search_result&search=neonatal+sepsis&selectedTitle=1~58 (09/07/2021)*
7. Efe İris N., Yıldırmak T., Gedik H., Şimşek F., Aydın D., Demirel N., Yokuş O. Could neutrophil CD64 expression be used as a diagnostic parameter of bacteremia in patients with febrile neutropenia? *Turk. J. Haematol., 2017, vol. 34, no. 2, pp. 167–173. doi: 10.4274/tjh.2016.0123*
8. Geskey J.M., Beck M.J., Brummel G.L. Neonatal fever in the term infant: evaluation and management strategies. *Curr. Pediatr. Rev., 2008, vol. 4, no. 2, pp. 84–95. doi: 10.2174/157339608784462052*
9. Goswami S., Gupta R., Ramji S. Flow cytometry: an important diagnostic tool in critically ill preterm neonates with suspected sepsis. *Am. J. Perinatol., 2022, vol. 39, no. 6, pp. 616–622. doi: 10.1055/s-0040-1718370*
10. Hornik C.P., Benjamin D.K., Becker K.C., Benjamin D.K. Jr., Li J., Clark R.H., Cohen-Wolkowiez M., Smith P.B. Use of the complete blood cell count in late-onset neonatal sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2012, vol. 31, no. 8, pp. 803–807. doi: 10.1097/INF.0b013e31825691e4*
11. Manzoli T.F., Troster E.J., Ferranti J.F., Sales M.M. Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit. *J. Crit. Care, 2016, vol. 33, pp. 84–89. doi: 10.1016/j.jcrc.2016.01.027*

12. Mathur N.B., Agarwal H.S., Maria A. Acute renal failure in neonatal sepsis. *Indian J. Pediatr., 2006, vol. 73, no. 6, pp. 499–502. doi: 10.1007/BF02759894*
13. Meisel C., Schefold J.C., Pschowski R., Baumann T., Hetzger K., Gregor J., Weber-Carstens S., Hasper D., Keh D., Zuckermann H., Reinke P., Volk H.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2009, vol. 180, no. 7, pp. 640–648. doi: 10.1164/rccm.200903-0363OC*
14. Mohammad Yusuf M., Chowdhury M.A. Correlation of blood gas status with the mortality of neonates admitted in ICU. *Northern Int. Med. Coll. J., vol. 9, no. 1, pp. 261–263.*
15. Newman T.B., Puopolo K.M., Wi S., Draper D., Escobar G.J. Interpreting complete blood counts soon after birth in newborns at risk for sepsis. *Pediatrics, 2010, vol. 126, no. 5, pp. 903–909. doi: 10.1542/peds.2010-0935*
16. Ng P.C., Li G., Chui K.M., Chu W.C., Li K., Wong R.P., Chik K.W., Wong E., Fok T.F. Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatr Res., 2004, vol. 56, no. 5, pp. 796–803. doi: 10.1203/01.PDR.0000142586.47798.5E*
17. Pek J.H., Yap B.J., Gan M.Y., Seethor S.T.T., Greenberg R., Hornik C.P.V., Tan B., Lee J.H., Chong S.L. Neurocognitive impairment after neonatal sepsis: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open, 2020, vol. 10, no. 6: e038816. doi: 10.1136/bmjopen-2020-038816*
18. Pham Thi Ngoc Thao, Nguyen Ly Minh Duy, Tran Thanh Tung, Pham Van Loi, Le Hung Phong, Trang Hong Thuy Duong. The value of sepsis index (Neutrophil CD64/Monocyte HLA-DR expression) in sepsis/septic shock patients. *HCM City Journal of Vietnamese Medicine, 2020, vol. 24 (suppl.), no. 2, pp. 138–144.*
19. Pugni L., Ronchi A., Bizzarri B., Consonni D., Pietrasanta C., Ghirardi B., Fumagalli M., Ghirardello S., Mosca F. Exchange transfusion in the treatment of neonatal septic shock: a ten-year experience in a neonatal intensive care unit. *Int. J. Mol. Sci., 2016, vol. 17, no. 5: 695. doi: 10.3390/ijms17050695*
20. Ree I.M.C., Fustolo-Gunnink S.F., Bekker V., Fijnvandraat K.J., Steggerda S.J., Lopriore E. Thrombocytopenia in neonatal sepsis: Incidence, severity and risk factors. *PLoS One, 2017, vol. 12, no. 10: e0185581. doi: 10.1371/journal.pone.0185581*
21. Report on the Expert Meeting on Neonatal and Paediatric Sepsis, 8 June 2010. *European Medicines Agency. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/report-expert-meeting-neonatal-paediatric-sepsis_en.pdf (09/07/2021)*
22. Rudd K.E., Johnson S.C., Agesa K.M., Shackelford K.A., Tsoi D., Kievlan D.R., Colombara D.V., Ikuta K.S., Kissoon N., Finfer S., Fleischmann-Struzek C., Machado F.R., Reinhart K.K., Rowan K., Seymour C.W., Watson R.S., West T.E., Marinho F., Hay S.I., Lozano R., Lopez A.D., Angus D.C., Murray C.J.L., Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet, 2020, vol. 395, no. 10219, pp. 200–211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7*
23. Sorsa A. Epidemiology of neonatal sepsis and associated factors implicated: observational study at neonatal intensive care unit of Arsi university teaching and referral hospital, South East Ethiopia. *Ethiop. J. Health. Sci., 2019, vol. 29, no. 3, pp. 333–342. doi: 10.4314/ejhs.v29i3.5*
24. Stoll B.J., Hansen N.I., Sánchez P.J., Faix R.G., Poindexter B.B., Van Meurs K.P., Bizzarro M.J., Goldberg R.N., Frantz ID 3rd, Hale E.C., Shankaran S., Kennedy K., Carlo W.A., Watterberg K.L., Bell E.F., Walsh M.C., Schibler K., Laptook A.R., Shane A.L., Schrag S.J., Das A., Higgins R.D.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. *Pediatrics, 2011, vol. 127, no. 5, pp. 817–826. doi: 10.1542/peds.2010-2217*
25. Van den Hoogen A., Gerards L.J., Verboon-Maciolek M.A., Fleer A., Krediet T.G. Long-term trends in the epidemiology of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility of causative agents. *Neonatology, 2010, vol. 97, no. 1, pp. 22–28. doi: 10.1159/000226604*
26. WHO. Newborns: improving survival and well-being. *URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/newborns-reducing-mortality (06.07.2021)*
27. WHO. Shining a spotlight on maternal and neonatal sepsis: World Sepsis Day, 2017. *URL: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/maternal_perinatal/world-sepsis-day/en (06.07.2021)*

Авторы:
Нгуен Т.Б., д.м.н., зам. зав. гематологическим отделением Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам; Ханойский медицинский университет, Ханой, Вьетнам;
Нгуен Т.Н.Т., д.м.н., отделение общей медицины Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам;
Данг Т.Х., врач гематологического отделения Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам;
Нгуен Б.Н., доктор медицины, отделение гематологии Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам;
Чыонг Т.М.Х., профессор, д.м.н., отделение неотложной помощи Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам;
Ле Т.Х., менеджер неонатального центра Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам;
Ле Н.Д., зав. отделением неотложной помощи Вьетнамской национальной детской больницы, Ханой, Вьетнам.

Authors:
Nguyen T.B., PhD, MD, Deputy Head of Hematology Department, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam; Hanoi Medical University, Hanoi City, Vietnam;
Nguyen T.N.T., PhD, MD, General Department, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam;
Dang T.H., MD, Hematology Department, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam;
Nguyen B.N., MD, Hematology Department, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam;
Truong T.M.H., Professor, PhD, MD, Emergency Department, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam;
Le T.H., Manager of Neonatal Center, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam;
Le N.D., Head of Emergency Department, Vietnam National Children's Hospital, Hanoi City, Vietnam.

Поступила в редакцию 02.01.2022
Отправлена на доработку 19.02.2022
Принята к печати 07.04.2022

Received 02.01.2022
Revision received 19.02.2022
Accepted 07.04.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 133–140

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 133–140

SYSTEMIC CANDIDOSIS DIAGNOSTIC TEST WITH CANDIDA SCORE AND MONOCYTE COUNT IN PREMATURE INFANTS WITH LATE-ONSET SEPSIS: RESEARCH IN LOW RESOURCES COUNTRY

I. Ratridewi[a], K. Amalia[a], T.E.C.J. Huwae[a], M.A. Putera[b], E. Sulistijono[a]

[a] *Saiful Anwar Hospital, Malang, Jawa Timur, Indonesia*
[b] *Melati Husada Hospital, Malang, Jawa Timur, Indonesia*

Abstract. *Introduction.* Candida is the cause of most systemic fungal infections that plays a role in the pathophysiology of sepsis in newborns, especially in premature infants with late-onset sepsis. The Candida score can be used to assess the occurrence of systemic candidosis where a Candida score > 2.5 can accurately identify patients who are at high risk for candidiasis infection. Monocytes also play an important role in preventing candida invasion. *Materials and methods.* This study used a cross sectional research design. Data was collected from premature infants with late-onset sepsis being suspected of systemic candidosis in neonatology inpatient ward. It was submitted from the period of November-December 2021. It takes a minimum of 31 samples to meet the criteria to process and analyze the data. The data obtained were processed and analyzed using the Receiver Operating Characteristic (ROC) method to obtain the Area Under Curve (AUC) value. Based on the AUC curve, the search for the most optimal intersection is carried out to obtain the sensitivity and specificity values. *Results.* Of the 31 research subjects, the number of subjects with positive PCR results was 27 (76.93%) while negative were 4 respondents (12.9%). The mean value of PCR density in the positive group of subjects was 76.93 and the range was 40.23–122.78. Meanwhile, in the group of subjects who were negative, the PCR density value was 0. The results of the Candida score diagnostic test showed that the sensitivity obtained was 81%. Higher sensitivity and specificity > 70% were found in the combined examination of Candida scores and monocyte counts according to cut-off compared with separate examinations. *Conclusions.* The combined examination of Candida score and monocyte count can be used as a diagnostic test for systemic candidosis in premature infants with late-onset sepsis, and could be used to consider the initiation of empirical antifungal therapy, either prophylactically or therapeutically, especially in limited laboratory facilities in Indonesia.

Key words: *Candida score, diagnostic test, late onset sepsis, monocyte count, premature infant, systemic candidosis.*

Адрес для переписки:
Ирэн Ратридеви
65111, Индонезия, Восточная Ява, г. Маланг, ул. Джакса Агунг Супрапто, 2, Больница Сайфул Анвар.
Тел.: +6282244126339.
E-mail: Irene24.fk@ub.ac.id

Contacts:
Irene Ratridewi
65111, Indonesia, Jawa Timur, Malang, Jaksa Agung Suprapto, 2, Saiful Anwar Hospital.
Phone: +6282244126339.
E-mail: Irene24.fk@ub.ac.id

Для цитирования:
Ратридеви И., Амалия Х., Хувеа Т.Э.К.Ю., Путера М.Э., Сулистихоно Э. Системный кандидозный диагностический тест с использованием шкалы Candida score и подсчетом моноцитов у недоношенных новорожденных с поздним сепсисом: исследование в стране с ограниченными ресурсами // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 133–140. doi: 10.15789/2220-7619-SCD-2012

Citation:
Ratridewi I., Amalia K., Huwae T.E.C.J., Putera M.A., Sulistijono E. Systemic candidosis diagnostic test with Candida score and monocyte count in premature infants with late-onset sepsis: research in low resources country // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 133–140. doi: 10.15789/2220-7619-SCD-2012

© Ratridewi I. et al., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SCD-2012

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

СИСТЕМНЫЙ КАНДИДОЗНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ТЕСТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШКАЛЫ CANDIDA SCORE И ПОДСЧЕТОМ МОНОЦИТОВ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ПОЗДНИМ СЕПСИСОМ: ИССЛЕДОВАНИЕ В СТРАНЕ С ОГРАНИЧЕННЫМИ РЕСУРСАМИ

Ратридеви И.[1], Амалия Х.[1], Хувеа Т.Э.К.Ю.[1], Путера М.Э.[2], Сулистихоно Э.[1]

[1] Больница Сайфула Анвара, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия
[2] Больница Мелати Хусада, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия

Резюме. *Введение. Candida* является причиной большинства системных грибковых инфекций, играющих роль в патофизиологии сепсиса у новорожденных, особенно у недоношенных детей с поздним началом сепсиса. Шкала Candida score может использоваться для оценки возникновения системного кандидоза, где балл > 2.5 может точно идентифицировать пациентов с высоким риском заражения кандидозом. Моноциты также играют важную роль в предотвращении инвазии *Candida. Материалы и методы.* В настоящем исследовании использовался дизайн перекрестного исследования. Данные были собраны у недоношенных детей с поздним сепсисом при подозрении на системный кандидоз в стационаре для новорожденных, в период с ноября по декабрь 2021 г. Для соответствия критериям обработки и анализа данных требуется минимум 31 образец. Полученные данные были обработаны и проанализированы с использованием метода рабочих характеристик приемника (ROC) для получения значения площади под кривой (AUC). На основе кривой AUC осуществлялся поиск наиболее оптимального пересечения для получения значений чувствительности и специфичности. *Результаты.* Из 31 обследованных лиц количество с положительными результатами ПЦР составило 27 (76.93%), а с отрицательными — 4 респондента (12.9%). Среднее значение плотности ПЦР в положительной группе испытуемых составило 76.93, а диапазон — 40.23–122.78. При этом в группе испытуемых с отрицательным результатом значение плотности ПЦР равнялось 0. Результаты диагностического теста Candida score показали, что чувствительность составила 81%. Более высокая чувствительность и специфичность > 70% были обнаружены при комбинированном исследовании с использованием шкалы Candida score и подсчетом количества моноцитов в соответствии с отсечкой по сравнению с раздельными исследованиями. *Выводы.* Комбинированное исследование с использованием шкалы Candida score и подсчетом количества моноцитов может быть использовано в качестве диагностического теста на системный кандидоз у недоношенных детей с поздним сепсисом для рассмотрения вопроса о начале эмпирической противогрибковой терапии, как профилактической, так и терапевтической, особенно в условиях ограниченных возможностей лабораторной диагностики в Индонезии.

Ключевые слова: *шкала Candida score, диагностический тест, поздний сепсис, количество моноцитов, недоношенный ребенок, системный кандидоз.*

Introduction

Neonatal sepsis is one of the complications of preterm birth and is an ongoing global public health challenge with 30% morbidity and 13–56% mortality with 42% of them dying in the first week of birth worldwide. Neonatal sepsis was divided into early-onset sepsis (EOS) and late-onset sepsis (LOS) based on the age at which EOS was due to intrauterine infection, and LOS was associated with postnatal nosocomial infection, with the highest incidence reported between day 10 and day 22 of life [36]. Candida is the cause of most systemic fungal infections that play a role in the pathophysiology of sepsis in newborns.

Despite the current transformational improvements in better diagnostics and management strategies, Increased length of time in hospital and higher management costs are among the concerns that add to the burden on hospitals. The candida diagnosis in newborns with sepsis can be established by the Candida score and a simple examination with the monocyte count which has been developed as a means to identify critical care patients who are at high risk of benefiting from empiric antifungal therapy in limited health facilities [13, 35].

The Candida score can be used to assess which systemic candidosis occurredcandidate score > 2.5 can accurately identify patients at high risk for candidiasis infection with a sensitivity of 81% and a specificity of 74%. Monocytes also play an important role in preventing candida invasion based on studies in mice. Monocytes depend primarily on non-opsonic phagocytosis via Dectin-land Dectin-2. This phenomenon has the potential to be of major clinical relevance in preterm infants, where b-1,3-glucan is a major constituent of the cells of several microorganisms including candida, which is a commensal fungus commonly found in hospital environments [33, 34].

The combined examination between Candida scores and monocyte counts in limited laboratory facilities is expected to be the gold standard for the diagnosis of systemic candidosis and can be used for early antifungal administration since the patient is diagnosed with sepsis. However, there is no study that combines Candida scores and monocyte counts as a diagnostic of systemic candidosis in premature infants with late-onset sepsis.

Materials and methods

This study used a cross-sectional approach and sampling method with consecutive sampling from data on premature infants with late-onset sepsis clinically suspected of systemic candidosis in November-

Table 1. Results combined diagnostic test between Candida score and monocyte count on PCR

Diagnostic test	PCR Candida		Total
	Positive	Negative	
Candida score > 2.5 + monocytes > 5% (Positive)	20	1	21
Candida score < 2.5/monocyte < 5% (Negative)	7	3	10
Total	27	4	31

December 2021 in the neonatology inpatient ward, Dr. R.S. Saiful Anwar, Malang. The sample size was calculated by using the receiver operating characteristic (ROC) diagnostic test formula. It takes a minimum sample of 31 patients, populations that meet the inclusion criteria are taken as respondents. The inclusion criteria in this study were infants born inside or outside the RSSA with ballard score plots > 28 weeks to < 37 weeks with sepsis criteria > 72 hours; patients receiving antibiotic therapy for bacterial sepsis with LOS; and the patient did not receive previous antifungal drug therapy.

Blood sampling was carried out once, namely at the beginning of the study in the RSA neonatology inpatient ward. The volume of blood taken from each study sample was 5 ml.Blood monocytes were obtained by differential centrifugation of heparinized blood on a Ficoll-Hypaque gradient. The monocyte lymphocyte layer was harvested and washed 2× with buffered saline containing 0.5 IU heparin per ml, after which the cell suspension was approximately 1.0×10^7 to 1.5×10^7 monocytes per ml, 3.5×10^7 in Hanks balanced salt containing containing 0.1% (wt/vol) gelatin was prepared.Furthermore, serum samples were made by centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes, and stored at 4°C for further measurement of serum PCR and candida culture. Measurement of Candida score based on rounded Candida score = 1x (total parenteral nutrition) + 1x (post surgery) + 1x (multifocal species candida colonization) + 2x (severe sepsis). PCR measurement Using 1 pair of primers which amplifies the target genome sequence. PCR uses real time. Measurements were carried out once, namely at the beginning of the study. This research is a diagnostic test study, which is to test the accuracy of a diagnostic tool by comparing the results of the examination using the tool with other examination standards. Furthermore, The data obtained were processed and analyzed using the receiver operating characteristic (ROC) method to obtain the area under curve (AUC) value of the tool being tested. The AUC curve is then searched for the best intersection point to be processed in order to obtain the sensitivity and specificity of a diagnostic tool.

Results

In this study, two methods were used to diagnosed systemic candidosis, namely using the Candida score and monocyte profile then compared with the results of the examination. Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of *Candida* species. The PCR

Table 2. Characteristics of research subjects

Characteristics	Score
Gender, n (%)	
Male	17 (54.8)
Female	14 (45.2)
Born, n (%)	
In	10 (32,3)
Outside	21 (67.7)
Gestational age, n (%)	
< 28 weeks	2 (6.5)
28 – < 32 weeks	9 (29)
32 – < 37 weeks	20 (64.5)
Mode of Birth, n (%)	
Sectio Caesarea	27 (87.1)
Vaginal spontaneous	4 (12.9)
Treatment Room, n (%)	
NICU	21 (67.7)
Perinatology	10 (32,3)
Breathing apparatus, n (%)	
CPAP/CNO	9 (29)
Endotracheal tube ventilator	11 (35.5)
Low flow nasal canule	1 (3,2)
Non-invasive ventilator	10 (32.23)
Birth weight, n (%)	
< 1000 grams	1 (3)
1000–2000 grams	23 (74)
2100–2500 grams	7 (23)
Days of treatment at the previous hospital, n (%)	
< 5 days	11 (55)
> 5 days	9 (45)
Surgery, n (%)	
Not	19 (61.3)
Yes	12 (38.7)
Administration of antibiotics, n (%)	
< 15 days	17 (54.8)
> 15 days	14 (45.2)
IV Line Installation, n (%)	
Central (CVC, umbilical catheter)	30 (96.8)
Peripheral	1 (3,2)
Length of stay in hospital, n (%)	
< 15 days	17 (54.8)
> 15 days	14 (45.2)
Infant nutrition, n (%)	
Breast milk	14 (45.2)
Breast milk + formula milk	17 (54.8)
Formula milk	–

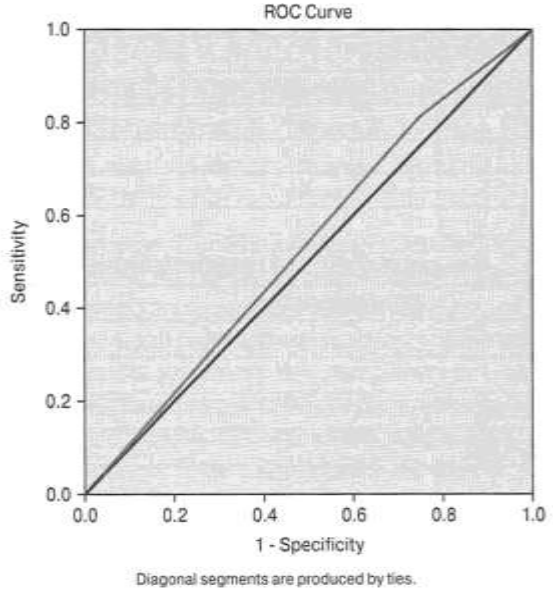


Figure 1. ROC graph of Candida scores compared with PCR

Note. The interpretation of this figure indicates that the candidate score can be used as a diagnostic test in the poor/weak category. Based on the cut-off test for the cut-off value of the Candida score of 2.5.

result which combined with the monocyte count is shown in Table 1. To find out the distribution of data on Candida scores and monocyte profiles, normality testing was carried out using the Shapiro–Wilk test (number of samples < 50). The data is declared normal if sig > 0.05. The data were also tested for homogeneity to find out whether the data in this study had homogeneous/heterogeneous variance. The variance of the data is homogeneous if sig > 0.05. The characteristics of research subject are being shown in Table 2. The results of the normality test showed that the Candida scores were not normally distributed (sig < 0.05) while the monocyte profiles were normally distributed (sig > 0.05). Both variables have homogeneous variance (sig > 0.05). Of the 31 research subjects, the number of subjects with positive PCR results was 27 (76.93%) while negative were 4 respondents (12.9%). The mean value of PCR density in the positive group of subjects was 76.93 and the range was 40.23–122.78. Meanwhile, in the group of subjects who were negative, the PCR density value was 0. The results of the Candida score diagnostic test showed that the sensitivity obtained was 81%. These results illustrate the ability of the Candida score in diagnosing systemic candidosis of 81%. The resulting positive predictive value is also quite high (88%). However, the RKP value is still very small, namely 1.08 where the diagnostic result is said to be good if the RKP > 10. While the RKN value is still high where the diagnostic result will be good if the RKN < 0.1. So that the Candida score diagnostic test is still not fully accurate. The results of the AUC Candida score resulted in an area value of > 50%, namely 53.2% (p = 0.837) which indicated that the diagnostic value of the Candida score was still very weak (Fig. 1). The results of the monocyte profile diagnostic test showed that the sensitivity obtained was 93%. These results illustrate the ability of monocyte profiles in diagnosing systemic candidosis which is 93% higher than the Candida score, and it is shown in Fig. 2. The positive predictive value is equal to the sensitivity of 93%. However, judging from the RKP value < 10 which indicates the diagnostic results are still not good even though the RKN is around 0.1. The results of the AUC monocyte profile resulted in an area value of > 50%, namely 71.2% (p = 0.175) which indicated that the diagnostic value of the monocyte profile was still quite good. RKN 50%, which is 71.2% (p = 0.175) which indicates that the diagnostic value of the monocyte profile is still quite good. RKN 50%, which is 71.2% (p = 0.175) which indicates that the diagnostic value of the monocyte profile is still quite good. RKN = (1–sensitivity)/specificity = (1–0.75)/0.74 = 0.35. Candidate score diagnostic test results, monocyte profile against candida PCR. Table 2 shows a sensitivity of 74% which tends to be lower than the results of separate diagnoses. However, the specificity value obtained is higher, namely 75%. The Positive Presumptive Value of the combined examination of Candida scores and monocyte profiles was 95% increased and higher than the results of separate diagnoses. The positive probability ratio of 2.96 also increased even though it was still < 10. The combined AUC results of Candida scores and monocyte profiles resulted in an area value of > 50%, namely 74.5% (p = 0.118) which indicated a fairly good diagnostic value and a higher value than the separate examination.

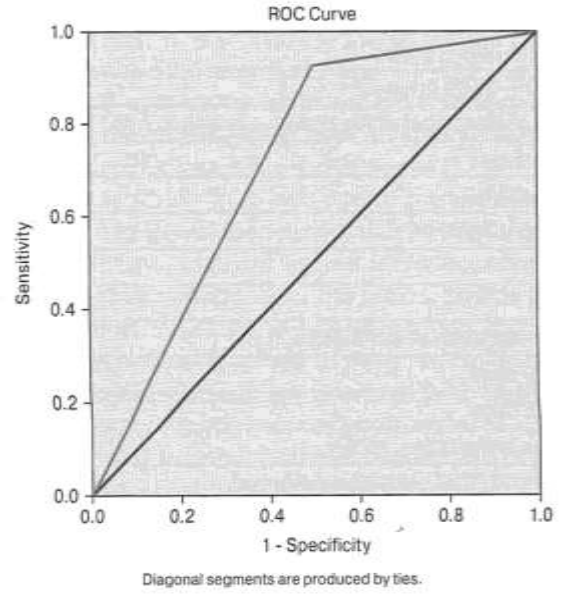


Figure 2. Graph of ROC of monocyte count compared to PCR

Note. The interpretation of this figure shows that monocyte count can be used as a diagnostic test with good category. Based on the cut-off test for the monocyte count cut-off value > 5%.

Discussion

Based on the characteristics of the research subjects, samples of premature infants (boys and girls) were diagnosed with late onset sepsis. More male subjects than female subjects (54.8% and 45.2%). In accordance with research conducted by Avila et al in 2019, premature infants with late onset sepsis accompanied by candida infection were more male subjects than female subjects, namely 60% while the study conducted by Aziz et al in 2020 contained male and female subjects. women with a ratio of 1.9:1 [1, 2, 30, 31, 32].

Research conducted by El-atawi et al 2017 states Low birth weight (> 2500 g) and earlier gestational age (29–32 weeks) were found to be commonly associated with systemic candida in neonates.In this study, 31 study subjects had a gestational age range of < 28–36 weeks, with the number of subjects with gestational age < 28 weeks as much as 6.5%, gestational age 28–32 weeks as many as 29%, and gestational age between 33–36 week as much as 64.5%. Among the 31 subjects, patients found 3% with birth weight (bbl) < 1000 grams, 74% with 1000–2000 grams, and 23% with 2100–2500 grams. Infants with very low birth weight (LBW < 1000 grams) are at the highest risk of developing systemic candidosis [4, 34].

Systemic candidosis is an important cause of LOS in premature neonates in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). In this study, 67.7% of the samples were treated in the NICU Hospital and 32.3% of the samples were treated in the Neonatology Hospital. Among them 32.3% were born in the RSSA, and 67.7% were born outside the RSSA. With the length of treatment < 15 days as many as 54.8% and > 15 days as much as 45.2%. Where prospective multicenter cohort study of 2847 infants in the NICU found a significant association between catheter and antibiotic use (particularly in relation to invasive procedures and treatments) and the incidence of systemic candidosis.

In this study, 54.8% of samples with antibiotic use > 15 days and 45.2% of samples with < 15 days of antibiotic use were obtained. It was previously known that the type and amount of antibiotics, such as the third generation cephalosporins, vancomycin or carbapenems, can predispose to candida infection, especially in the host with a compromised immune system. Repeated or long-term use of antibiotics will damage the normal flora balance, causing the proliferation of *Candida albicans* [25, 26, 27, 28, 29].

Central intravenous insertion (CVC) can be a predilection risk factor for fungal colonization. In 31 research subjects, there were 96.8% of patients using CVC and 3.2% of patients using peripheral venous access. Neonates with LBW often require central vascular catheterization (CVC) for parenteral nutrition and administration of antibiotics during long periods of hospitalization. The main types of CVC and means of access to the neonate are umbilical catheters, central catheters inserted through a peripheral vein (PICC), central venous catheters through direct puncture of the femoral, jugular or subclavian vein, and central venous catheters inserted surgically by means of venous dissection. The most common life-threatening complication of CVC is catheter-associated bloodstream infection (CR-BSI), and CR-BSI is also associated with high costs [24, 25].

From the 31 research subjects, the number of subjects with positive PCR results was 27 (76.93%) while negative were 4 respondents (12.9%). The mean value of PCR density in the positive group of subjects was 76.93 and the range was 40.23–122.78. Meanwhile, in the group of subjects who were negative, the PCR density value was 0. In a study conducted by Ratridewi et al., PCR had a sensitivity rate of 69.2% and a specificity of 71% in diagnosing systemic candidosis in children with malignancy with severe neutropenia. In this study, real time PCR was used where 1 set of primers was used for DNA identification and then the amplified sequence was connected to a fluorescent probe that emits light when it binds to the amplification product [23, 26, 35].

Non-culture based methods, such as DNA detection by PCR, have been developed to aid in the rapid diagnosis of infection, enabling the initiation of empiric antifungal therapy at 6 hours after the onset of sepsis. A scoring system has been developed to guide empirical antifungal therapy for patients colonized with *Candida* spp. using a Candida score [17, 18, 19, 20, 21, 22].

From the 31 study subjects, 80% of patients were positive for candida PCR, and 20% of patients were negative for candida PCR with Candida scores > 2.5. Meanwhile, patients with a Candida score < 2.5 found about 22% of patients with positive PCR *Candida* and 78% of patients with negative PCR *Candida*. In this study, a candidate score > 2.5 had a sensitivity of 81% and a specificity of 25% with a positive predictive value of 88% and a negative predictive value of 16.67%. In a study conducted by Lambiotte in 2017 stated the relationship between initiation of antifungal agents and Candidate scores are quite satisfactory in this study. The frequency of empirical antifungal therapy in Lambiotte's study were 2.3%, 27.6%, 41,2%, and 75% in patients with Candida score of 2, 3, 4, and 5 respectively. Furthermore, in a study conducted by Ratridewi et al. in 2020 in patients with malignancy and severe neutropenia, the Candida score had a sensitivity of 84.6% and a specificity of 71.1% in diagnosing systemic candidosis [17, 26].

Scoring systems such as the Candida score have been developed as a means to identify high-risk critical care patients who may benefit from empiric antifungal therapy. A scoring system was conducted to evaluate potential antifungal uses which could have economic, and medical implications. A Candida score of more than 3 is an indication for early antifungal administration [13].

From the 31 study subjects, 27 patients had monocyte values > 5% and 4 patients with monocytes < 5%. Where of the 27 patients with monocytes > 5%, 92% of the patients were positive for candida PCR and 8% with negative for candida PCR. While 4 patients with monocytes < 5%, 50% of them with positive PCR candida and 50% with negative PCR candida. With a sensitivity value of 93% and a specificity of 50% in this test. These results illustrate the ability of the monocyte profile to screen for systemic candidosis which is 93% higher than the Candida score.

Monocytes have lower numbers in peripheral blood than neutrophils, but very important in defense against bacterial and fungal infections, as phagocytosis to kill pathogens in the body, regulate inflammatory responses through the release of chemoattractants, inflammatory cytokines, and activate adaptive immune responses. Monocytes are produced early in pregnancy (before 20 weeks) and represent 7–38% of all circulating mononuclear cells in the vasculature of term infants. The cut off of the normal monocyte count is < 5% [15, 16].

Premature infants have immature immune systems, with low innate and acquired immunity. The immune system in premature infants compared to term infants only has low levels of monocytes and neutrophils, is unable to kill pathogens and low cytokine production is limited to T cell activation and decreased ability to fight bacteria and detect viruses in cells. Intrauterine inflammation is a major cause of preterm birth resulting in premature immune system activation and cytokine production. This can lead to immune tolerance leading to decreased immune function of the newborn. Intrauterine inflammation is associated with an increased incidence of early-onset sepsis and has long-term adverse immune consequences [14].

Two recent studies have demonstrated that both classical and nonclassical monocytes from preterm infants are relatively unresponsive to stimulation of the Toll-like receptor (TLR), which monocytes also function for phagocytes. Monocyte CD64 expression was similar between preterm and term infants, and increased at early gestational age of 24–31 weeks. Preterm birth is driven by various inflammatory factors, particularly infection, which can alter monocyte phenotype and function at birth, as well as in the postnatal period and beyond. Three main subsets of monocytes have been described in humans, based on the cell surface expression of CD14, coreceptors for cell wall components of gram-negative lipopolysaccharide (LPS), and CD16 (IgG Fc FcgR-III receptor). In adult peripheral blood, monocytes ($CD14^{++}CD162$) constitute the majority (0.80%) of monocytes [11, 12].

The remaining monocyte pool consists of classical ($CD14^{++}CD16^{+}$) and non-classical ($CD14^{+}CD16^{+}$) monocytes. Prior to classification into two distinct subsets, $CD16^{+}$ monocytes were collectively referred to as proinflammatory monocytes due to their capacity to produce higher levels of inflammatory cytokines compared to classical monocytes ($CD14^{++}CD16$). $CD16^{+}$ monocytes also develop in neonates, children, and adults in sepsis, suggesting an active role for these cells during invasive infection. However, although non-classical and classical $CD16^{+}$ monocytes are closely related at the molecular level (determined by the microarray gene expression profile), the former has been shown to produce higher levels of proinflammatory cytokines (e.g., TNFα and IL-1β0 [3, 8, 9, 10, 37].

Monocytes too plays an important role in preventing candida invasion based on studies in mice. Monocytes depend primarily on non-opsonic phagocytosis via Dectin-1and Dectin-2. Recent studies have suggested that substimulator doses of a candida pattern recognition receptor (PRR) agonist have been shown to induce epigenetic changes in human monocytes, but also in other innate immune cells leading to an increased response to re-stimulation after a period of rest. This phenomenon is called "immune innate training" by Natea and is strongly induced by stimulation of the C-type lectin receptor (CLR) dectin-1 by b-1,3-glucan. This phenomenon has the potential to be of major clinical relevance in preterm infants, where b-1,3-glucan is a major constituent of the cells of several microorganisms including candida, which is a commensal fungus commonly found in the hospital setting [5, 6, 7].

From the 31 research subjects, 21 patients with Candida scores > 2.5 and monocytes > 5% and 10 patients with Candida scores < 2.5 and monocytes < 5%. Where of the 21 patients with Candida scores > 2.5 and monocytes > 5% there were 95% of patients with positive PCR Candida and 5% patients with negative PCR Candida. Meanwhile, from 10 subjects with a Candida score < 2.5 and monocytes < 5%, 70% of the patients were positive for Candida PCR and 30% of patients were negative for Candida PCR. The results of the diagnostic test of Candida scores and monocyte profiles against Candida PCR resulted in a sensitivity of 74% which tended to be lower than the results of separate diagnoses. However, the specificity value obtained is higher, namely 75%.

There has been no study that has tested the Candida score and monocyte profile simultaneously for early diagnosis of systemic candidosis. However, from previous studies, these two tests were carried out separately, it was found that there was a high sensitivity with the same cut-off value, and can be used as a tool for early detection of systemic candidosis in premature infants with late-onset sepsis. In this study, these two tests when carried out in combination had a sensitivity rate of 74% lower than the diagnostic results separately. This is possible because the sample size is not representative of the population of premature infants with sepsis and the research time is too short, as well as the baby's immune response to candida is different for each individual. However, the speci-

ficity value obtained is higher, namely 75% compared to separate diagnostic tests. Where these two tests can be considered as an early diagnostic test for systemic candida in premature infants with late onset sepsis.

This research has several shortcomings. The sample in this study could not represent the total sample size of premature infants treated in Neonatology Department of Saiful Anwar Hospital Malang, and the samples used in this study were only premature infants with late onset sepsis. Another drawback is that this study was not used for evaluation before and after empirical antifungal administration. Only done for inspection at a time only.

Acknowledgements

The authors of this study want to express their gratitude to all of the other colleague in Pediatric Division of Saiful Anwar General Hospital for all of their support.

References

1. Avila-Aguero M.L., Canas-Coto A., Ulloa-Gutierrez R., Caro M.A., Alfaro B., Paris M.M. Risk factors for Candida infections in a neonatal intensive care unit in Costa Rica. *Int. J. Infect. Dis., 2005, vol. 9, no. 2, pp. 90–95. doi: 10.1016/j.ijid.2004.05.007*
2. Aziz M., Patel A.L., Losavio J., Iyengar A., Berven M., Schloemer N., Jakubowicz A., Mathai T., McAuley J.B. Efficacy of fluconazole prophylaxis for prevention of invasive fungal infection in extremely low birth weight infants. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2010, vol. 29, no. 4, pp. 352–356. doi: 10.1097/INF.0b013e3181bf8eb1*
3. De Jong E., Strunk T., Burgner D., Lavoie P.M., Currie A. The phenotype and function of preterm infant monocytes: implications for susceptibility to infection. *J. Leukoc. Biol., 2017, vol. 102, no. 3, pp. 645–656. doi: 10.1189/jlb.4RU0317-111R*
4. El-Atawi K., Elhalik M., Kulkarni T., Abdelsamed A., Alexander L., Alexander L., Satyan A.D., Mahfouz R. Evolving invasive neonatal systemic candidiasis, a review. *J. Pediatr. Neonatal Care, 2017, vol. 6, no. 6: 00271. doi: 10.15406/jpnc.2017.06.00271*
5. Greenberg R.G., Kandefer S., Do B.T., Smith P.B., Stoll B.J., Bell E.F., Carlo W.A., Laptook A.R., Sánchez P.J., Shankaran S., Van Meurs K.P., Ball M.B., Hale E.C., Newman N.S., Das A., Higgins R.D., Cotten C.M.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Late-onset sepsis in extremely premature infants: 2000–2011. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2017, vol. 36, no. 8, pp. 774–779. doi: 10.1097/INF.0000000000001570*
6. Hernández-Castro R., Arroyo-Escalante S., Carrillo-Casas E.M., Moncada-Barrón D., Alvarez-Verona E., Hernández-Delgado L., Torres-Narváez P., Lavalle-Villalobos A. Outbreak of Candida parapsilosis in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur. J. Pediatr., 2010, vol. 169, no. 7, pp. 783–787. doi: 10.1007/s00431-009-1109-7*
7. Hsieh E., Smith P.B., Jacqz-Aigrain E., Kaguelidou F., Cohen-Wolkowiez M., Manzoni P., Benjamin D.K. Jr. Neonatal fungal infections: when to treat? *Early Hum. Dev., 2012, vol. 88 (suppl. 2), pp. S6–S10. doi: 10.1016/S0378-3782(12)70004-X*
8. İstanbullu K., Köksal N., Çetinkaya M., Özkan H., Yakut T., Karkucak M., Doğan H. The potential utility of real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk. J. Pediatr., 2019, vol. 61, no. 4, pp. 493–499. doi: 10.24953/turkjped.2019.04.004*
9. Jaya I.G.A., Suryawan I.W.B., Rahayu P.P. [The relationship of prematurity with the incidence of neonatal sepsis treated in the perinatology ward and the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) Wangaya Hospital, Denpasar city]. *Intisari Sains Medis, 2019, vol. 10, no. 1, pp. 18–22. doi: 10.15562/ism.v10i1.319*
10. Jordan J.A. PCR identification of four medically important Candida species by using a single primer pair. *J. Clin. Microbiol., 1994, vol. 32, no. 12, pp. 2962–2967. doi: 10.1128/jcm.32.12.2962-2967.1994*
11. Kang C.M., Chen X.J., Chih C.C., Hsu C.C., Chen P.H., Lee T.F., Teng L.J., Hsueh P.R. Rapid identification of bloodstream bacterial and fungal pathogens and their antibiotic resistance determinants from positively flagged blood cultures using the BioFire FilmArray blood culture identification panel. *J. Microbiol. Immunol. Infect., 2020, vol. 53, no. 6, pp. 882–891. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.018*
12. Kara S.S., Kahveci H., Doğan H., Laloğlu F., Cayir A. Toll-like receptor polymorphism associated with neonatal sepsis in term babies. *Firat Med. J., 2020, vol. 25, no. 2, pp. 90–96.*
13. León C., Ruiz-Santana S., Saavedra P., Almirante B., Nolla-Salas J., Alvarez-Lerma F., Garnacho-Montero J., León M.A.; EPCAN Study Group. A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. *Crit. Care Med., 2006, vol. 34, no. 3, pp. 730–737. doi: 10.1097/01.CCM.0000202208.37364.7D*
14. Lordier L., Meskaldji D.E., Grouiller F., Pittet M.P., Vollenweider A., Vasung L., Borradori-Tolsa C., Lazeyras F., Grandjean D., Van De Ville D., Hüppi P.S. Music in premature infants enhances high-level cognitive brain networks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2019, vol. 116, no. 24, pp. 12103–12108. doi: 10.1073/pnas.1817536116*
15. Lupetti A., Tavanti A., Davini P., Ghelardi E., Corsini V., Merusi I., Boldrini A., Campa M., Senesi S. Horizontal transmission of Candida parapsilosis candidemia in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol., 2002, vol. 40, no. 7, pp. 2363–2369. doi: 10.1128/JCM.40.7.2363-2369.2002*
16. Manzoni P. Invasive Fungal Infections (IFI) in Neonates. *URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-invasive-fungal-infections-ifi-neonates-state-art-paolo-manzoni_en.pdf (01.07.2022)*
17. Manzoni P., Arisio R., Mostert M., Leonessa M., Farina D., Latino M.A., Gomirato G. Prophylactic fluconazole is effective in preventing fungal colonization and fungal systemic infections in preterm neonates: a single-center, 6-year, retrospective cohort study. *Pediatrics, 2006, vol. 117, no. 1: e22-32. doi: 10.1542/peds.2004-2227*
18. Michalski C., Kan B., Lavoie P.M. Antifungal immunological defenses in newborns. *Front. Immunol., 2017, vol. 8: 281. doi: 10.3389/fimmu.2017.00281*
19. Nicholls J.M., Yuen K.Y., Tam A.Y. Systemic fungal infections in neonates. *Br. J. Hosp. Med., 1993, vol. 49, no. 6, pp. 420–424.*
20. Ningrum N.D., Suswihardhyono A.N.R. [Maternal and infant factors that influence the incidence of early-onset neonatal sepsis in premature infants]. *Jurnal Kedokteran Diponegoro, 2015, vol. 4, no. 4, pp. 1331–1341.*

21. Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., Ostrosky-Zeichner L., Kullberg B.J. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers, 2018, vol. 4: 18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26*
22. Pauline Voie M., Tunby J., Strømsvik N. Collaboration challenges faced by nurses when premature infants are discharged. *Nurs Child Young People, 2018, vol. 30, no. 2, pp. 33–38. doi: 10.7748/ncyp.2018.e960*
23. Puopolo K.M., Mukhopadhyay S., Hansen N.I., Cotten C.M., Stoll B.J., Sanchez P.J., Bell E.F., Das A., Hensman A.M., Van Meurs K.P., Wyckoff M.H.; NICHD Neonatal Research Network. Identification of extremely premature infants at low risk for early-onset sepsis. *Pediatrics, 2017, vol. 140, no. 5: e20170925. doi: 10.1542/peds.2017-0925*
24. Putra P.J. [Incidence and factors associated with neonatal sepsis at Sanglah Hospital, Denpasar]. *Sari Pediatr., 2012, vol. 14, no. 3, pp. 205–210.*
25. Rahmawati P., Mayetti M., Rahman S. [Relationship between neonatal sepsis and birth weight in babies at RSUP Dr. M. Djamil Padang]. *Andalas J. Health., 2018, vol. 7, no. 3, pp. 405–410.*
26. Ratridewi I., Juwita N., Putera M.A., Nugroho S. [The role of Candida score as a diagnostic method of invasive candidiasis against severe neutropenia in children with malignancy]. *Sari Pediatr., 2021, vol. 22, no. 6, pp. 351–358.*
27. Rhee C.J., Rios D.R., Kaiser J.R., Brady K. Cerebral hemodynamics in premature infants. *Neonatal Med., 2018, vol. 25, no. 1, pp. 1–6. doi: 10.5385/nm.2018.25.1.1*
28. Roilides E., Farmaki E., Evdoridou J., Francesconi A., Kasai M., Filioti J., Tsivitanidou M., Sofianou D., Kremenopoulos G., Walsh T.J. Candida tropicalis in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J. Clin. Microbiol., 2003, vol. 41, no. 2, pp. 735–741. doi: 10.1128/JCM.41.2.735-741.2003*
29. Shane A.L., Sánchez P.J., Stoll B.J. Neonatal sepsis. *Lancet, 2017, vol. 390, no. 10104, pp. 1770–1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4*
30. Şular F.-L., Iancu M., Cucerea M., Moldovan E., Ognean M.L., Dobreanu M. Oxidative burst of neonatal and adult peripheral blood phagocytes confronting Escherichia coli and Candida albicans. *Rom. Biotechnol. Lett., 2020, vol. 25, no. 2, pp. 1340–1347. doi: 10.25083/rbl/25.2/1340.1347*
31. Swanson J.R., Gurka M.J., Kaufman D.A. Risk Factors for invasive fungal infection in premature infants: enhancing a targeted prevention approach. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc., 2014, vol. 3, no. 1, pp. 49–56. doi: 10.1093/jpids/pit068*
32. Tezer H., Canpolat F.E., Dilmen U. Invasive fungal infections during the neonatal period: diagnosis, treatment and prophylaxis. *Expert Opin. Pharmacother., 2012, vol. 13, no. 2, pp. 193–205. doi: 10.1517/14656566.2012.647685*
33. Tirodker U.H., Nataro J.P., Smith S., LasCasas L., Fairchild K.D. Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J. Perinatol., 2003, vol. 23, no. 2, pp. 117–122. doi: 10.1038/sj.jp.7210868*
34. Trovato L., Betta P., Romeo M.G., Oliveri S. Detection of fungal DNA in lysis-centrifugation blood culture for the diagnosis of invasive candidiasis in neonatal patients. *Clin. Microbiol. Infect., 2012, vol. 18, no. 3: E63-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03731.x*
35. Vogel K., Pierau M., Arra A., Lampe K., Schlueter D., Arens C., Brunner-Weinzierl M.C. Developmental induction of human T-cell responses against Candida albicans and Aspergillus fumigatus. *Sci. Rep., 2018, vol. 8, no. 1: 16904. doi: 10.1038/s41598-018-35161-5*
36. White P.L., Williams D.W., Kuriyama T., Samad S.A., Lewis M.A., Barnes R.A. Detection of Candida in concentrated oral rinse cultures by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol., 2004, vol. 42, no. 5, pp. 2101–2107. doi: 10.1128/JCM.42.5.2101-2107.2004*
37. Wynn J.L. Defining neonatal sepsis. *Curr. Opin. Pediatr., 2016, vol. 28, no. 2, pp. 135–140. doi: 10.1097/MOP.0000000000000315*

Авторы:

Ратридеви И., врач педиатрического отделения (тропическая и инфекционная медицина) больницы Сайфула Анвара, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия;
Амалия Х., врач педиатрического отделения больницы Сайфула Анвара, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия
Хувеа Т.Э.К.Ю., врач отделения ортопедии и травматологии (хирургия кисти и микрохирургия) больницы Сайфула Анвара, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия;
Путера М.Э., врач отделения неотложной помощи больницы Мелати Хусада, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия;
Сулистихоно Э., врач педиатрического отделения (неонатология) больницы Сайфула Анвара, г. Маланг, Восточная Ява, Индонезия.

Authors:

Ratridewi I., Dr., SpA(K), Saiful Anwar Hospital, Pediatric Department, Division of Tropical and Infection Medicine, Malang, Jawa Timur, Indonesia;
Amalia K., Dr., SpA, Saiful Anwar Hospital, Pediatric Department, Malang, Jawa Timur, Indonesia;
Huwae T.E.C.J., Dr., SpOT(K), Saiful Anwar Hospital, Orthopaedic and Traumatology Department, Division of Hand and Microsurgery, Malang, Jawa Timur, Indonesia;
Putera M.A., Dr., Melati Husada Hospital, Emergency Department Staff, Malang, Jawa Timur, Indonesia;
Sulistijono E., Dr., SpA(K), Saiful Anwar Hospital, Pediatric Department, Division of Neonatology, Malang, Jawa Timur, Indonesia.

Поступила в редакцию 07.08.2022
Принята к печати 10.01.2023

Received 07.08.2022
Accepted 10.01.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 141–146

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 141–146

A PREDICTIVE PERFORMANCE ANALYSIS OF VITAMIN D DEFICIENCY USING A DECISION TREE MODEL

F. Osmani

Infectious Disease Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Abstract. *Background.* HBV infection is a major health problem which may be life-threatening. Vitamin D (VD) is involved in various pathophysiological mechanisms in a plethora of diseases. And also, there is a strong demand for the prediction of its severity using different methods. The study aims to evaluate performance of DT as one of the machine learning models in the prediction of severity in vitamin D deficiency. *Methods.* In total, data containing serum VD levels were collected from 292 CHB patients. The independent characteristics such as: age, sex, weight, height, zinc, BMI, body fat, sunlight exposure, and milk consumption were used for prediction of VD deficiency. 60% of them were allocated to a training dataset randomly. To evaluate the performance of decision-tree the remaining 40% were used as the testing dataset. The validation of the model was evaluated by ROC curve. *Results.* The prevalence of VD deficiency was high among patients (63.0%). The final experimentation results showed that DT classifier achieves better accuracy of 96 % and outperforms well on training and testing of VD dataset. Also, the areas under the ROC curve AUC is 0.78, when we applied DT algorithm with the significant variables by cross validation, the values of AUC = 0.78 and 85.3% accuracy were obtained. *Conclusion.* We concluded that the serum level of Zn is an important associated risk factor for identifying cases with vitamin D deficiency. Also, the risk of VD deficiency could be predicted with high accuracy using decision tree learning algorithm that could be used for antiviral therapy in CHB patients.

Key words: *vitamin D deficiency, decision tree, machine learning, hepatitis B virus, vitamin D, ROC curve.*

ПРОГНОЗНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИ ДЕРЕВА РЕШЕНИЙ

Османи Ф.

Исследовательский центр инфекционных заболеваний, Бирджандский университет медицинских наук, г. Бирджанд, Иран

Резюме. *Актуальность.* Печень является основным местом синтеза витамина D (ВД), участвующего в различных патофизиологических механизмах при различных заболеваниях. Поэтому важно спрогнозировать степень дефицита ВД при помощи различных методов. Наше исследование было направлено на оценку эффективности дерева решений (DT) как одной из моделей машинного обучения для прогнозирования степени дефицита ВД. *Методы.* Всего было обследовано 292 пациента с ХГВ. У каждого из них определен уровень ВД в сыворотке. Для прогнозирования дефицита ВД использовались независимые характеристики, такие как возраст, пол, вес, рост, содержание цинка, индекс массы тела, жировые отложения, частота и продолжительность воздействия солнечного света и потребление молока. Информация 60% пациентов была внесена в обучающий набор данных случайным образом. Для оценки эффективности дерева решений результаты иссле-

Адрес для переписки:
Фрэштэх Османи
Иран, г. Бирджанд, Исследовательский центр инфекционных заболеваний, Бирджандский университет медицинских наук.
Тел.: +0915 163-76-53.
E-mail: dr.osmani68 @gmail.com

Contacts:
Freshteh Osmani
Iran, Birjand, Infectious Disease Research Center, Birjand University of Medical Sciences.
Phone: +0915 163-76-53.
E-mail: dr.osmani68 @gmail.com

Для цитирования:
Османи Ф. Прогнозный анализ эффективности дефицита витамина D с использованием модели дерева решений // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 141–146. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-1642

Citation:
Osmani F. A predictive performance analysis of vitamin D deficiency using a decision tree model // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 141–146. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-1642

© Osmani F., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOT-1642

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

дований оставшихся 40% пациентов были использованы в качестве набора данных тестирования. Валидация модели оценивалась кривой ROC. *Результаты.* Распространенность дефицита ВД среди пациентов была высокой (63,0%). Окончательные результаты экспериментов показали, что классификатор DT обеспечивает точность 96% и превосходит по производительности при обучении и тестировании набора данных о ВД. Кроме того, площади под кривой ROC AUC составила (0,78) при применении алгоритма DT со значимыми переменными путем перекрестной проверки, с получением значения AUC = 0,78 и точности 85,3%. *Заключение.* Мы пришли к выводу, что уровень цинка в сыворотке крови является важным сопутствующим фактором риска для выявления случаев дефицита ВД. Кроме того, риск дефицита ВД можно предсказать с высокой точностью с использованием алгоритма обучения дерева решений. Полученные данные можно применять в ходе противовирусной терапии у пациентов с ХГВ.

Ключевые слова: *дефицит витамина D, дерево решений, машинное обучение, вирус гепатита B, витамин D, кривая ROC.*

Introduction

HBV infection is a major health problem which may be life-threatening due to its frequent severe complications. In the other hand, VD is an essential vitamin that has powerful influence on several parts of the human body. Nearly one billion people highly suffered from VDD across the globe [4].

Most chronic conditions such as autoimmune diseases and infectious diseases can be affected by VD levels. VDD is a public health problem and is highly prevalent worldwide, so that, it's prevalence is reported 79% in Iranian adults [5].

There is strong evidence about the association between VD and various chronic liver diseases in different stages [29]. Previous studies have reported that there is an association between vitamin D and hematological factors [3]. Machine learning models will be useful in discovering new patterns of the etiology and thus preventive public health measures can be applied effectively. The traditional severity prediction of VDD have used questionnaires with statistical models such as Linear Regression (LR) [9].

In previous studies, the results were compared between the statistical models and they have not used the machine learning algorithms for the severity prediction. The traditional statistical model like LR is used to predict the severity of VDD but its performance is deprived due to its predictive performance limit and many parameters [7, 10]. Currently, the analysis of VD status is highly expensive, and it is identified using the biochemical methods. The research gap identified urges to condense the cumbersome analytical procedures in identifying VDD among the patients [28].

So, the main objective of this study is to evaluate the DT classifier in the prediction of severity in VDD. And also determine the associated risk factors related with VDD by using DT algorithm, in an Iranian CHB patients.

Method

Two hundred and ninety-two HBV-infected patients were enrolled for this cross-sectional study. Patients were selected randomly according to consent to participate. In this study, we used input parameters such as age, sex (male/female), weight (kgs), height (m), BMI (kg/m), grade and the activity of fibrosis, Sunlight Exposure/Day (hrs.).

Written consent was obtained from the all of patients. Patients with any auto-immune diseases, other viral hepatitis (HCV, HDV, and HIV) and other causes of liver disease, VD, calcium supplement use or injection in the last six months were excluded.

The inclusion criteria were: patients who were admitted to the infectious disease's outpatient clinic with the diagnosis of CHB with the approval of the infectious specialist and willingness to participate in the study.

The laboratory tests were performed with 10 cc of venous blood was taken from patients (14 h overnight fast). The serum levels of VD were measured using a COBAS e411 analyzer, manufactured by Mannheim Roch diagnostic Gmbh in Germany, with the Elecsys kit (REF 0589413). CBC was measured in whole blood samples.

Total VD levels were measured in the serum samples, then, VD status was classified as normal (≥ 30 ng/ml), insufficient (20–29.9 ng/ml), and deficient (< 20 ng/ml) [27, 31].

Decision Tree (DT). DT Classifier is a well-known supervised ML tool that is used for solving classification problems and it has a tree-like model or graphs. The DT can capture the decision-making knowledge from the given data [12]. In DT that every branch indicates the output of the test set and every leaf node represents the particular label. The classification rules are represented by the path from the root node to the leaf node.

For our VDD severity modeling, each node in the tree predicts the deficiency severity and each branch indicates the states of the variable [19].

ROC curve. ROC curves are used to evaluate the performance of multiclass classifier problems. The ROC curve has false positive rate on X-axis and true positive rate on Y-axis. In the ROC curve topmost left edge of the plot considered to be the ideal point and the steepness of the curve also very important since the TPR value should maximize and the FPR should be minimized [20].

Statistical analysis. All statistical analyses were carried out using R version 3.4.2. The significance

Table. Characteristics of variables

Variables		Training dataset	Validation dataset	Pearson correlation coefficients	p value
Age		36±12	35±11	0.32	< 0.01
Sex	Male	72.7%	73.1%		
	Female	27.3%	26.9%	-0.03	0.008
BMI		24.20±4.21	25.32±2.84	0.10	< 0.001
AFP (U/L)		6.56±16.51	6.69±21.49	0.10	< 0.001
AST (U/L)		54.17±23.73	55.78±31.62	0.12	< 0.001
ALT (U/L)		61.84±36.89	61.84±38.19	0.06	0.008
Hemoglobin (Hb)		14.03±1.47	14.03±1.62	-0.02	0.005
Albumin (g/dL)		3.39±0.47	3.40±0.53	0.05	0.064
Platelet count (× 10^9/L)		216.48±53.64	214.55±55.5	0.07	< 0.12

in all of these tests was two-tailed with a 5% significant level. The ROC curve sensitivity, specificity were measured for comparison. Several types of DT learning techniques (CART) [15], C4.5 [26], were implemented on the datasets.

Results

Generally, 48.6% were male; with mean age 29±5.3; and 52.2% female with mean age (31.5±7.8). The data were divided into a training and testing dataset (60% vs 40%) respectively. A decision tree was built on the training dataset. The testing dataset were used to assess the model. Gini index was used for selecting the variables in the algorithm to achieve final tree. The training and test datasets were similar to each other roughly. The results showed that, age, BMI as potential predictors of VDD (P value < 0.001) (Table). Hence, these variables were used in DT model.

DT was learned for the training dataset by using variables with significant correlation with VDD (P value < 0.001).

The final DT, with size 17, 9 leaves and 6 layers is shown in Fig. 1

Fig. 2 showed the accuracy, ROC curve, sensitivity, specificity values for predicting VDD in training set. The areas under the ROC curves is (0.78),

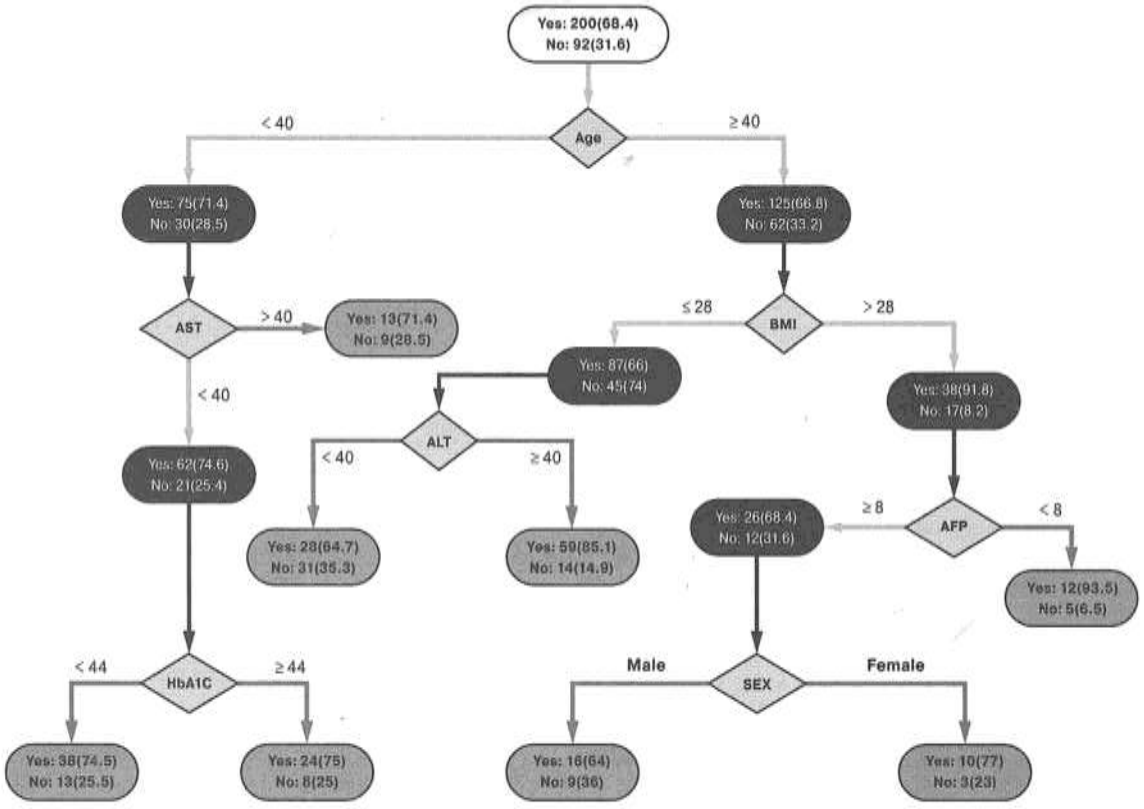


Figure 1. Decision tree with training dataset in CHB group (model 2)

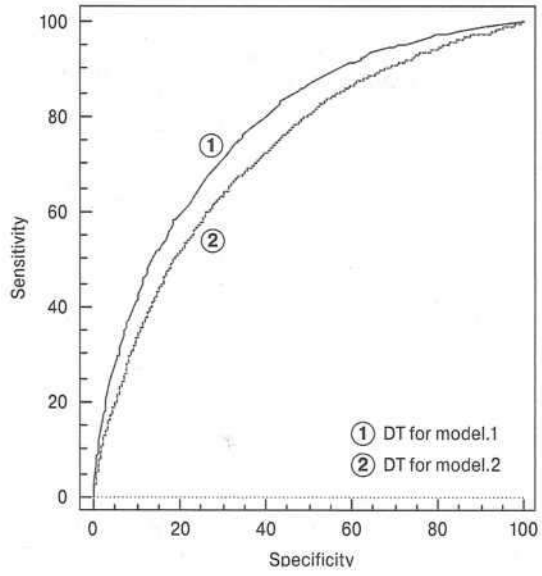


Figure 2. ROC curve of both decision tree models

When we applied DT algorithm with the significant variables by cross validation, the values of 0.78 ROC and 85.3% accuracy were obtained, which is similar to the obtained results of applying training and test sets one by one.

Discussion

The main objective of this study is to evaluate the performance of machine learning model in the prediction of VDD. The prediction accuracy was calculated and compared with the training and testing set. We have used various parameters in the severity prediction.

A main strength of the current study was that it has explored a new application of the DT model for examining and evaluating the predicators related to VDD among CHB Iranian population. Result of this study showed that the serum zinc as a potential factor of VDD which is similar with previous studies [21, 23].

This study shows that insufficiency of VD occurs more frequently among CHB patients.

A high prevalence of VDD (> 80 %) in chronic liver disease has been reported to be associated with liver disease progression [25]. VDD occurs rather often among the elderly population[22].

In the current study, deficiency and severe VDD were observed more frequently in patients with HBV-related liver disease and were found significantly associated with the end-stage of liver cirrhosis; so, our study is in line with previous studies which have indicated an association of VD levels with CHB [5]. The results of this research work proved that the machine learning models especially the random forest classifier accurately predict the severity of VDD [14]. This machine learning classifier will have a greater opportunity in the real-world medical domain which would assist experts to efficiently identify the severity of VDD.

The future direction of our research is to validate the model with a different type of VD datasets of all age groups.

In a period (1990–2010), the prevalence of VDD was studied in Iranian society and according to the results, in all regions; both sexes had moderate and significant VDD [2, 32]. A study showed that VDD existed in many CHB patients. Decreased liver function due to HBV-induced injuries to liver cells can be one of the causes of VDD in CHB [24, 30].

One of the interesting finding of this study was the pretense of serum zinc as a substantial factor for VDD which is in line with other researches [15].

A previous study has shown a significant correlation between serum level of VD and low serum levels of zinc among Iranian population aged 10–18 years old [6]. In addition, another study had reported a statistically association between serum level of VD and serum levels of zinc among Iranian pregnant women. Their findings showed 37% VDD and 23% of them had zinc deficiency [8].

Data mining analysis has the potential ability to select patients with VDD based on the possibility of response to treatment against a various factors. Moreover, it may provide a rationale to improve the efficacy of therapy. Similarly, CART analysis recognized several variables which were not associated with response by standard statistical model significantly [18]. The fitted DT model could identify few demographic characteristics such as age and sex as significant factors associated with VDD.

In this study, significant association was found between serum levels of vitamin D3 and BMI. In the different studies on the prevalence of VDD showed that VDD prevalence was various based on regions and Iranian population [1, 16]. In this study, however, VDD was not related with liver function parameters, probably due to that VD serum levels are affected by different factors [11, 13, 17].

One of the limitations of this study was influencing factors such as seasonal variation, diet and geographical habitation on Serum VD levels. We recommend more sensitivity and specificity prediction models, which be able to specify having VDD exactly.

Conclusion

This study provides an easy to use classification rules for classifying risk factors related with VDD that can be useful to improve programs for its management.

Acknowledgement

We would like to thank all the study subjects for their participation, Dentistry Clinical Research Development Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran for consulting.

Conflict of interest

The author declares that there is no conflict of interest.

Ethics approval

This study was approved by the ethics board committee of Birjand University of Medical Sciences, reference number: IR.BUMS.REC.1398.324.

References

1. Azarkar G., Doosti Z., Osmani F., Ziaee M. Analysis of risk factors for nonalcoholic fatty-liver disease in hepatitis B virus infection: a case-control study. *Hepat. Med., 2019, vol. 11: 153. doi: 10.2147/HMERS211106*
2. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology, 1996, vol. 24, no. 2, pp. 289–293. doi: 10.1002/hep.510240201*
3. Chen E.-Q., Shi Y., Tang H. New insight of vitamin D in chronic liver diseases. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 2014, vol. 13, no. 6, pp. 580–585.*
4. Coussens A.K., Wilkinson R.J., Hanifa Y., Nikolayevskyy V., Elkington P.T., Islam K., Timms P.M., Venton T.R., Bothamley G.H., Packe G.E., Darmalingam M., Davidson R.N., Milburn H.J., Baker L.V., Barker R.D., Mein C.A., Bhaw-Rosun L., Nuamah R., Young D.B., Drobniewski F.A., Griffiths C.J., Martineau A.R. Vitamin D accelerates resolution of inflammatory responses during tuberculosis treatment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2012, vol. 109, no. 38, pp. 15449–15454. doi: 10.1073/pnas.1200072109*
5. Efe C., Kav T., Aydin C., Cengiz M., Imga N.N., Purnak T., Smyk D.S., Torgutalp M., Turhan T., Ozenirler S., Ozaslan E., Bogdanos D.P. Low serum vitamin D levels are associated with severe histological features and poor response to therapy in patients with autoimmune hepatitis. *Dig. Dis. Sci., 2014, vol. 59, no. 12, pp. 3035–3042. doi: 10.1007/s10620-014-3267-3*
6. Farnik H., Bojunga J., Berger A., Allwinn R., Waidmann O., Kronenberger B., Keppler O.T., Zeuzem S., Sarrazin C., Lange C.M. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 1270–1276. doi: 10.1002/hep.26488*
7. Ghaziasadi A., Ziaee M., Norouzi M., Malekzadeh R., Alavian S.M., Saberfar E., Judaki M.A., Ghamari S., Khedive A., Namazi A., Rahimnia R., Jazayeri S.M. The prevalence of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) variations and correlation with the clinical and serologic pictures in chronic carriers from Khorasan Province, North-East of Iran. *Acta Med. Iran, 2012, vol. 50, no. 4, pp. 265–272.*
8. Han J., Pei J., Kamber M. Data mining: concepts and techniques: 3rd ed. *Burlington: Morgan Kaufmann Publishers, 2012, pp. 83–124.*
9. Hauge Matzen L., Christensen J., Hintze H., Schou S., Wenzel A. Diagnostic accuracy of panoramic radiography, stereo-scanography and cone beam C.T. for assessment of mandibular third molars before surgery. *Acta Odontol. Scand., 2013, vol. 71, no. 6, pp. 1391–1398. doi: 10.3109/00016357.2013.764574*
10. Heshmat R., Mohammad K., Majdzadeh S., Forouzanfar M., Bahrami A., Ranjbar Omrani G, Nabipour I., Rajabian R., Hossein-Nezhad A., Rezaei Hemami M., Keshtkar A., Pajouhi M. Vitamin D deficiency in Iran: a multi-center study among different urban areas. *Iran J. Public Health, 2008, vol. 37, no. 1, pp. 72–78.*
11. Hewison M. Vitamin D and immune function: autocrine, paracrine or endocrine? *Scand J. Clin. Lab. Invest., 2012, vol. 72, no. 243, pp. 92–102. doi: 10.3109/00365513.2012.682862*
12. Hoan N.X., Van Tong H, Le Huu Song C.G.M., Velavan T.P. Vitamin D deficiency and hepatitis viruses-associated liver diseases: a literature review. *World J. Gastroenterol., 2018, vol. 24, no. 4: 445. doi: 10.3748/wjg.v24.i4.445*
13. Kitson M.T., Roberts S.K. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J. Hepatol., 2012, vol. 57, no. 4, pp. 897–909. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.033*
14. Mahamid M., Nseir W., Elhija O.A., Shteingart S., Mahamid A., Smamra M., Koslowsky B. Normal vitamin D levels are associated with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *World J. Hepatol., 2013, vol. 5, no. 6: 328. doi: 10.4254/wjh.v5.i6.328*
15. Mohamadkhani A., Katoonizadeh A., Poustchi H. Immune-regulatory events in the clearance of HBsAg in chronic hepatitis B: focuses on HLA-DP. *Middle East J. Dig. Dis., 2015, vol. 7, no. 1: 5.*
16. Osmani F. Effect evaluation of vitamin D level amongst patients with chronic hepatitis B. *Arch. Pathol. Clin. Res., 2019, vol. 3, pp. 20–21. doi: 10.29328/journal.apcr.1001014*
17. Osmani F. Problems with reporting accuracy in COVID-19 statistics in Iran. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 275–277.*
18. Osmani F., Hajizadeh E., Rasekhi A., Akbari M.E. Analyzing relationship between local and metastasis relapses with survival of patients with breast cancer: a study using joint frailty model. *Int. J. Cancer Manag., 2018, vol. 11, no. 12: e81783. doi: 10.5812/ijcm.81783*
19. Osmani F., Ziaee M. Assessment of the risk factors for vitamin D3 deficiency in chronic hepatitis B patient using the decision tree learning algorithm in Birjand. *Inform. Med. Unlocked, 2021, vol. 23: 100519. doi: 10.1016/j.imu.2021.100519*
20. Parvaie P., Majd H.S., Ziaee M., Sharifzadeh G., Osmani F. Evaluation of gum health status in hemophilia patients in Birjand (a case-control study). *Am. J. Blood Res., 2020, vol. 10, no. 3: 54.*
21. Plum L.A., DeLuca H.F. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov., 2010, vol. 9, no. 12, pp. 941–955. doi: 10.1038/nrd3318*
22. Remelli F., Vitali A., Zurlo A., Volpato S. Vitamin D deficiency and sarcopenia in older persons. *Nutrients. 2019, vol. 11, no. 12: 2861. doi: 10.3390/nu11122861*
23. Schillie S., Xing J., Murphy T., Hu D. Prevalence of hepatitis B virus infection among persons with diagnosed diabetes mellitus in the United States, 1999–2010. *J. Viral. Hepat., 2012, vol. 19, no. 9, pp. 674–676. doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01616.x*
24. Shoaei S.D., Sali S., Karamipour M., Riahi E. Non-invasive histologic markers of liver disease in patients with chronic hepatitis B. *Hepat. Mon., 2014, vol. 14, no. 2: e14228. doi: 10.5812/hepatmon.14228*

25. Tabrizi R., Moosazadeh M., Akbari M., Dabbaghmanesh M.H., Mohamadkhani M., Asemi Z., Heydari S.T., Akbari M., Lankarani K.B. High prevalence of vitamin D deficiency among Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *Iran. J. Med. Sci., 2018 vol. 43, no. 2: 125.*
26. Tayefi M., Saberi-Karimian M., Esmaeili H., Zadeh A.A., Ebrahimi M., Mohebati M., Heidari-Bakavoli A., Azarpajouh M.R., Heshmati M., Safarian M., Nematy M., Parizadeh S.M.R., Ferns G.A., Ghayour-Mobarhan M. Evaluating of associated risk factors of metabolic syndrome by using decision tree. *Comp. Clin. Pathol., 2018, vol. 27, no. 1, pp. 215–223. doi: 10.1007/s00580-017-2580-6*
27. Torresi J., Tran B.M., Christiansen D., Earnest-Silveira L., Schwab R.H.M., Vincan E. HBV-related hepatocarcinogenesis: the role of signalling pathways and innovative ex vivo research models. *BMC Cancer, 2019, vol. 19, no. 1: 707. doi: 10.1186/s12885-019-5916-6*
28. Trépo E., Ouziel R., Pradat P., Momozawa Y., Quertinmont E., Gervy C., Gustot T., Degré D., Vercruysse V., Deltenre P., Verset L., Gulbis B., Franchimont D., Devière J., Lemmers A., Moreno C. Marked 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with poor prognosis in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol., 2013, vol. 59, no. 2, pp. 344–350. doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.024*
29. Tseng T.-C., Kao J.-H. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. *J. Gastroenterol., 2013, vol. 48, no. 1, pp. 13–21.*
30. Wang D., Wang Q., Shan F., Liu B., Lu C. Identification of the risk for liver fibrosis on CHB patients using an artificial neural network based on routine and serum markers. *BMC Infect. Dis., 2010, vol. 10, no. 1: 251. doi: 10.1186/1471-2334-10-251*
31. Wong G.L., Chan H.L., Chan H.Y., Tse C.H., Chim A.M., Lo A.O., Wong V.W. Adverse effects of vitamin D deficiency on outcomes of patients with chronic hepatitis B. *Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2015, vol. 13, no. 4, pp. 783–790.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2014.09.050*
32. Ziaei S., Norrozi M., Faghihzadeh S., Jafarbegloo E. A randomised placebo-controlled trial to determine the effect of iron supplementation on pregnancy outcome in pregnant women with haemoglobin ≥ 13.2 g/dl. *BJOG, 2007, vol. 114, no. 6, pp. 684–688. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01325.x*

Автор:
Османи Ф., д.н., кафедра биостатистики и эпидемиологии, Исследовательский центр инфекционных заболеваний, Бирджандский университет медицинских наук, г. Бирджанд, Иран.

Author:
Osmani F., PhD, Department of Biostatistics and Epidemiology, Infectious Disease Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

Поступила в редакцию 23.11.2020
Принята к печати 10.04.2021

Received 23.11.2020
Accepted 10.04.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 147–155

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 147–155

USE OF SOME BONE-RELATED CYTOKINES AS PREDICTORS FOR RHEUMATOID ARTHRITIS SEVERITY BY NEURAL NETWORK ANALYSIS

R.O. Saleh[a], L.A. Mahmood[b], M.A. Mohammed[c], K.F. Al-Rawi[d], H.K. Al-Hakeim[e]

[a] *Al-Maarif University College, Ramadi, Al Anbar Governorate, Iraq*
[b] *College of Medicine, University of Anbar, Ramadi, Al Anbar Governorate, Iraq*
[c] *General Directorate of Anbar Education, Ministry of Education, Al Anbar, Iraq*
[d] *College of Science, University of Anbar, Ramadi, Al Anbar Governorate, Iraq*
[e] *College of Science, University of Kufa, Kufa, Najaf Governorate, Iraq*

Abstract. *Background.* Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by synovial membrane inflammation that results in joint damage. Many earlier studies have measured cytokines for a better diagnosis of RA. In the present study, three bone biomarkers [osteopontin, stromelysin-1 (MMP3), and vascular endothelial growth factor-A (VEGF)] are examined for their ability to estimate the severity of disease by using artificial neural network (NN) analysis and binary logistic regression analysis. *Methods.* The study enrolled 87 RA patients and 44 healthy control subjects. The biomarkers were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay technique. Disease Activity Score (28 joints) and C-reactive protein (CRP) (DAS28-CRP) was calculated by using DAS28-CRP calculator. The patients with DAS28-CRP ≥ 5.1 αre considered as having high disease activity (HDA). While patients' group with DAS28-CRP < 5.1 are considered as moderate disease activity (MDA). The neural network (NN) analysis was used for the differentiation between groups. *Results.* Results showed that the most sensitive predictor for high disease activity (HDA) of RA is MMP3, followed by osteopontin and VEGF. These three biomarkers can differentiate significantly between HDA and MDA with a relatively high size effect (Partial $\eta^2 = 0.323$, $p < 0.001$). The HDA group has a significantly higher MMP3, CRP, RF, and anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) than the MDA group. MMP3 is strongly associated with two inflammatory indicators; CRP and ESR. *Conclusion.* There was a significant elevation in the serum level of MMP3 in RA patients with HDA compared to the MDA and control groups. High DAS28, RF, CRP, and ACPA were found in HDA patients compared with the MDA group. The use of the NN analysis indicated that the measured biomarkers help predict the HDA state in RA patients. MMP3 and osteopontin are diagnostic biomarkers for the severity of RA and are related to many disease-related characteristics with a sensitivity of 88.9% and specificity of 68.4%.

Key words: *rheumatoid arthritis, inflammation, neural network analysis, stromelysin-1, ACPA, osteopontin.*

Адрес для переписки:
Халид Ф. Аль-Рави
College of Science, University of Anbar, Ramadi,
Al Anbar Governorate, Iraq.
Тел.: +9647835303535.
E-mail: sc.kfwi72@uoanbar.edu.iq

Contacts:
Khalid F. Al-Rawi
College of Science, University of Anbar.
Phone: +9647835303535.
E-mail: sc.kfwi72@uoanbar.edu.iq

Для цитирования:
Салех Р.О., Махмуд Л.А., Мохаммед М.А., Аль-Рави Х.Ф., Аль-Хакейм Х.К. Использование ряда цитокинов, ассоциированных с костной тканью, в качестве предикторов тяжести ревматоидного артрита при помощи нейросетевого анализа // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 147–155. doi: 10.15789/2220-7619-UOS-2008

Citation:
Saleh R.O., Mahmood L.A., Mohammed M.A., Al-Rawi K.F., Al-Hakeim H.K. Use of some bone-related cytokines as predictors for rheumatoid arthritis severity by neural network analysis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 147–155. doi: 10.15789/2220-7619-UOS-2008

© Saleh R.O. et al., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-UOS-2008

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЯДА ЦИТОКИНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КОСТНОЙ ТКАНЬЮ, В КАЧЕСТВЕ ПРЕДИКТОРОВ ТЯЖЕСТИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА ПРИ ПОМОЩИ НЕЙРОСЕТЕВОГО АНАЛИЗА

Салех Р.О.[1], Махмуд Л.А.[2], Мохаммед М.А.[3], Аль-Рави Х.Ф.[4], Аль-Хакейм Х.К.[5]

[1] Университетский колледж Аль-Маариф, г. Рамади, провинция Аль-Анбар, Ирак
[2] Медицинский колледж, Университет Анбар, г. Рамади, провинция Аль-Анбар, Ирак
[3] Главное управление образования провинции Анбар, Министерство образования, провинция Аль-Анбар, Ирак
[4] Научный колледж, Университет Анбар, г. Рамади, провинция Аль-Анбар, Ирак
[5] Научный колледж, Университет Куфы, г. Куфа, провинция Наджаф, Ирак

Резюме. *История вопроса.* Ревматоидный артрит (РА) характеризуется воспалением синовиальной оболочки, приводящего к повреждению суставов. Многие более ранние исследования оценивали уровень цитокинов для улучшения диагностики РА. В настоящем исследовании для оценки тяжести заболевания с использованием нейронной сети и бинарного логистического регрессионного анализа были исследованы три костных биомаркера: остеопонтин, стромелизин-1 (MMP3) и фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF). *Методы.* В исследовании приняли участие 87 больных РА и 44 здоровых человека контрольной группы. Уровень биомаркеров определяли методом иммуноферментного анализа. Показатель активности заболевания (28 суставов) и С-реактивный белок (CRP) (DAS28-CRP) рассчитывали с помощью DAS28-CRP-калькулятора. Пациенты с DAS28-CRP ≥ 5,1 считаются имеющими высокую активность заболевания (ВАЗ), в то время как при DAS28-CRP < 5,1 заболевание расценивается как умеренно активное (УАЗ). Нейросетевой анализ использовался для дифференциации между группами. *Результаты.* Результаты исследования показали, что наиболее чувствительным предиктором высокой активности заболевания (HDA) РА является MMP3, за которым следуют остеопонтин и VEGF. Эти три биомаркера могут существенно дифференцировать HDA и MDA с относительно высокой эффективностью (частичный $\eta^2 = 0{,}323$, $p < 0{,}001$). Группа с ВАЗ имеет значительно более высокий уровень MMP3, CRP, RF и антител к цитруллинированному белку (ACPA), чем группа с УАЗ. MMP3 тесно связан с двумя индикаторами воспаления: СРБ и СОЭ. *Выводы.* Отмечалось значительное повышение уровня MMP3 в сыворотке крови и уровней у пациентов с РА с ВАЗ по сравнению с группой с УАЗ и контрольной группой. Высокие уровни DAS28, RF, CRP и ACPA были обнаружены у пациентов с ВАЗ по сравнению с группой пациентов с УАЗ. Использование нейросетевого анализа показало, что измеренные биомаркеры помогают прогнозировать ВАЗ у пациентов с РА. MMP3 и остеопонтин являются диагностическими биомаркерами тяжести заболевания РА с чувствительностью 88,9% и специфичностью 68,4% и связаны со многими характеристиками заболевания.

Ключевые слова: *ревматоидный артрит, воспаление, нейросетевой анализ, стромелизин-1, ACPA, остеопонтин.*

Background

Rheumatoid arthritis (RA) usually begins between the ages of 30 and 50 years old. Women, smokers, and those with a family history of the disease are at higher risk. It causes discomfort and stiffness in various joints, most commonly the wrists, proximal interphalangeal joints, and metacarpophalangeal joints. RA rarely affects the distal interphalangeal or lumbar spine. Patients may also have weariness, weight loss, and anemia [55]. RA is an autoimmune-inflammatory illness that often affects females and older individuals. It is characterized by joint discomfort that develops with time as a result of an autoimmune-inflammatory response [34]. Despite the fact that the cause of RA is yet unknown, a set of environmental and genetic aspects is attributed [54]. A number of parameters have been evaluated as potential predictors of RA diagnosis, prognosis, or follow-up of RA disease. Because RA is characterized by an inflammation of the synovial membrane that leads to the reduction and destruction of joints [3, 36], adhesion molecules, soluble mediators, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines [33, 53, 57], trace elements [1], adipokines [35] and various impacts of autoantibodies on joint inflammation and internal organ dysfunction, as well as structural abnormalities, are known [14]. Since the findings of the majority of criteria are not completely clear and definitive, the estimation of various inflammation-related cytokines continues to be an attractive subject of research. In the present work, the study focused on some of the less studied cytokines in RA including osteopontin (OPN), Stromelysin-1 (MMP3), and the vascular endothelial growth factor-A (VEGF). An OPN-rich extracellular matrix is present in mineralized tissues and extracellular fluids, especially at sites of inflammation [15, 61], where OPN combines osteoclasts and hydroxyapatite to enhance bone resorption [18]. In mice modeled with rheumatoid arthritis, OPN plays a critical role in the destruction of articular cartilage by promoting angiogenesis and inducing apoptosis in chondrocytes [60]. Earlier research showed a correlation between elevated levels of OPN and serum levels of inflammation markers, an increase in monocyte inflammatory molecules [63], and the number of T-helper 17 cells in the synovial fluid of RA patients [6, 37]. Furthermore,

in people with RA, plasma OPN was thought to be a biomarker of inflammatory bone damage [20]. Numerous studies have indicated that the OPN and its receptors, play key roles in RA pathogenesis [62].

The MMP3 enzyme is involved in the degradation of cartilage and bones and the destruction of extracellular matrix components in RA [41]. MMP3 level has been elevated in the synovium of RA patients where MMP3 concentration is around 250 times higher [7, 42]. A high MMP3 level correlates with the number of affected joints [59], and it could be used as a biomarker for both the diagnosis and the progress of the disease [7, 25]. MMP3 may be a biomarker for the disease, and it helps to break down extracellular matrix proteins in RA as the disease progresses. [39]. Serum levels of MMP3 were a sign of RA disease activity, bone and joint damage, medication susceptibility, and the outcome of the disease [25, 27]. After these findings, several researchers have recommended MMP3 testing as part of a routine examination to be used in conjunction with RA therapy choices [25].

There is an abundant expression of VEGF in synovial fluid and serum of RA patients [22] [58], which plays a key role in pannus formation and maintenance [58]. Patients with RA have high levels of VEGF in their blood and synovial fluid [58], which aids in the growth of blood vessels and their absorption by the synovial lining membrane in RA [31]. In a meta-analysis, significantly higher circulating VEGF levels in patients with RA were identified, and levels of VEGF are positively correlated with disease activity in RA [24]. The present study aims to use the abovementioned biomarkers (OPN, MMP3, and VEGF). in the current study to test the ability to differentiate between high disease activity (HDA) the moderate disease activity (MDA) of RA disease by using the artificial neural network analysis (NN) and binary and multivariate logistic analysis.

Methods

Participants. Eighty-seven RA patients (37 males and 50 females) and 44 age-matched healthy control subjects (18 males and 26 females) were recruited in the present case-control study. The samples were collected from the Ramadi Teaching Hospital in the Governorate of Anbar in Iraq, from June 2020 to January 2021. The European League Against Rheumatism and the American College of Rheumatology guidelines were used to diagnose RA in diseased subjects [2]. According to these diagnosis criteria, each patient should have a score > 6 based on the amount and location of painful joints, favorable serologic findings (anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) and rheumatoid factor (RF)), high C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR)), and duration of RA symptoms. These criteria were found to be more accurate in predicting the likelihood of RA and have a higher specificity [9]. The clinical characteristics and sociodemographic data of all study subjects have been collected. Body mass index (BMI) was calculated by dividing subjects' body weight (kilograms) by their height squared (squared meter).

The Disease Activity Score was calculated by using (DAS28-CRP) calculator available online at https://www.mdcalc.com/disease-activity-score-28-rheumatoid-arthritis-crp-das28-crp. We divided patients into those with HDA when DAS28-CRP ≥ 5.1 and those with MDA when DAS28-CRP < 5.1 [52]. The institutional review board (IRB) of the University of Anbar supplied the ethical approval of the study (Document number 211C/2020), which complied with the "International Guideline for Human Research" guidelines established by the Declaration of Helsinki. A thorough medical profile was taken on all participants to rule out any existing systemic disorders that may affect the results of the studied parameters, especially diabetes mellitus, liver and kidney diseases, and cardiovascular incidents. The first step to ensure the work's quality is to recruit patients who have no kidney problems. All patients had normal urea and creatinine. These results are important to exclude any excretion of small-molecular weight proteins by diseased kidneys. Subjects that smoked were also excluded from the study.

Power analysis, using a 2-tailed test at $\alpha = 0.05$ and assuming an effect size of 0.5 with a power of 0.80, shows that the required sample size is 127 participants as calculated by the sample size calculator (https://www.ai-therapy.com/psychology-statistics/sample-size-calculator). Therefore, we used more than the calculated number (131 subjects). The sample size analysis was accomplished according to the equations and principles mentioned in Fahim et al. (2019) [11]. Patients were included by a convenience sampling technique.

Measurements. Five milliliters of venous blood were extracted without a tourniquet from all subjects, after overnight fasting, and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes after full clotting. Sera were separated and stored at −80°C until they were analyzed. Based on the latex agglutination concept, serum CRP and RF were assessed using semi-quantitative kits provided by the Spinreact® Co., Girona, Spain. Kits supplied by Hotgen Biotech Co., Ltd., Beijing, China, were used to conduct a semi-quantitative ACPA examination. Sandwich ELISA assay kits provided by Mybiosource®, Inc., CA, USA, were used to assess serum MMP3, OPN, and VEGF. All of the kits' intra-assay coefficients of variance were less than 10%. The sensitivities of the ELISA kits were OPN < 0.1 pg/ml, MMP3 < 0.068 ng/ml, and VEGF < 1 pg/ml.

Statistical analysis. Kolmogorov–Smirnov test revealed that all biomarker findings were normally distributed. As a result, all data are provided in terms of mean and standard deviation. To compare meas-

ured variables across categories, the analysis of variance (ANOVA) test was performed. While the Chi-square (2) test was employed to determine the statistical significance of the difference between nominal variables. Pearson's correlation analysis was utilized to evaluate correlations between biomarkers and clinical and demographic variables. We used Point-Biserial Correlation Analysis to analyze the correlation between dichotomous variables (CRP, RF, and ACPA) and continuous variables (biomarkers). The "multivariate general linear model" (GLM) was used to examine associations between RA severity and measured biomarkers while adjusting for confounding factors such as age and BMI. The influence of each biomarker on the severity of rheumatoid arthritis was then determined using a between-subject effects test. The partial eta-squared (η^2) effect size was used in the study. Based on the levels of the biomarkers, various z-unit weighted scores were determined. The essential biomarkers that predict indeed observed biomarkers were evaluated using multiple regression analysis. We have used NN processing to evaluate the predictability of the existence of RA in a subject using input variables and biomarkers. This analysis used an artificial feedforward model of two hidden layers of mini-batch training and gradient descent. The stopping criteria were one successive move with no further decrease in the error expression. The research sample was split into three categories: training, testing, and holdout. The reference for the correlation coefficient is the values that are not due to the chance at $p < 0.05$. The correlation coefficient was regarded as low when it ranged from 0.10 to 0.29, moderate when it ranged from 0.30 to 0.49, and high when it ranged from 0.50 to 1.0 [8]. Area under the curve (AUC) cut-off value should be more than 0.5. The tests are two-tailed, with a statistical significance level of 0.05. The IBM SPSS package for Windows 10, Version 25, 2017, IBM Corp., New York, USA was used for biostatistical analysis.

Results

Demographic and clinical biomarkers. The results in Table 1 showed the demographic details of RA patients in comparison with those of healthy controls. There were no statistically significant variations in BMI or age between the groups. Table 1 also indicates that serum MMP3, RF, CRP, and ACPA levels were substantially higher in RA patients compared

Table 1. The clinical and demographic data in high disease activity (HDA) rheumatoid arthritis patients and moderate disease activity (MDA) and healthy controls (HC)

Variables	HC[A] (n = 44)	DAS < 5.1[B] (n = 34)	DAS ≥ 5.1[C] (n = 53)	F/χ^2	p
Age, years	48.41±5.26	48.09±5.25	49.72±6.01	1.084	0.341
Sex (Male/Female)	18/26	13/21	24/29	1.147	0.292
MI[B], kg/m²	24.38±2.90	25.70±2.86	25.59±3.19	2.533	0.083
DAS28	N/A	3.81±0.79C	7.70±0.74[B]	185.254	< 0.001
MMP-3, ng/ml	11.50±5.01[B,C]	17.31±8.20[A,C]	22.29±9.76[A,B]	21.712	< 0.001
VEGF, pg/ml	202.97±56.35[B,C]	128.92±42.82[A]	132.29±45.35[A]	31.941	< 0.001
OPN, ng/ml	3.03±1.20[C]	3.82±1.66	4.25±1.87[A]	6.897	0.001
Disease duration, years	0[B,C]	12.65±4.71[A]	11.06±5.13[A]	123.133	< 0.001
CRP –/+	44/0[B,C]	29/5[A,C]	19/34[A,B]	52.305	< 0.001
RF –/+	44/0[B,C]	28/6[A,C]	20/33[A,B]	47.806	< 0.001
ACPA –/+	44/0[B,C]	28/6[A,C]	20/33[A,B]	47.806	< 0.001

Notes. A, B, C: pair-wise comparisons (when a letter written on a number, it means that this number is significantly different from the values of the column that contain the letter over the column title), BMI: Body mass index, DAS28: Disease Activity Score-28, MMP3 (Stromelysin-1): Matrix metalloproteinase-3, VEGF: Vascular endothelial growth factor, RF: rheumatoid arthritis, CRP: C-reactive protein, ACPA: and anti-citrullinated protein antibodies, and OPN: osteopontin. The difference is considered significant when $p \leq 0.05$.

Table 2. The results of multivariate GLM analysis examining the differences in biomarkers between RA patients divided into those with high disease activity (HDA) and moderate disease activity (MDA)

Tests	Dependent variables	Explanatory variables	p	Partial η^2
Multivariate	All 3 biomarkers	Severity (HDA vs MDA)	< 0.001	0.323
		Sex	0.352	0.102
		BMI	0.002	0.163
		Age	0.152	0.063
Between-subject effects	MMP3	Severity (HDA vs MDA)	0.002	0.161
	VEGF	Severity (HDA vs MDA)	0.249	0.037
	Osteopontin	Severity (HDA vs MDA)	0.162	0.023

Note. Diagnosis: RA versus healthy controls, BMI: Body mass index, MMP3: Matrix metalloproteinase-3, and VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Table 3. The binary logistic regression analysis results with high disease activity (HDA) and moderate disease activity (MDA) as dependent variables and bone biomarkers as explanatory variables

Dependent variables	Explanatory variables*	B (SE)	p	OR	95% CI
MDA versus HDA	MMP-3	0.107 (0.037)	0.004	1.113	1.036–1.197
	VEGF	0.011 (0.007)	0.138	1.011	0.997–1.025
	Osteopontin	0.450 (0.168)	0.007	1.568	1.128–2.180

Note. (*): Standardized values, OR: Odd ratio, SE: standard error, CI: confidence interval, MMP3: Matrix metalloproteinase-3, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

to the control group with the highest level in DAS ≥ 5.1 patients' group. Serum VEGF showed a significant decrease in both patient groups in comparison with the control groups. While no significant difference between both patient groups. Patients with DAS ≥ 5.1 have significantly higher OPN than those with DAS < 5.1 and control groups. However, there was no substantial difference in the duration of disease between RA patient groups.

The results of multivariate GLM. Table 2 shows the effects of the multivariate GLM study, which showed that age (Partial $\eta^2 = 0.063$, $p = 0.152$) and sex (Partial $\eta^2 = 0.102$, $p = 0.352$) have no substantial impact on the three biomarkers. BMI had a slight effect on the levels of the three biomarkers (Partial $\eta^2 = 0.163$, $p = 0.002$). The severity of RA has a highly significant effect (Partial $\eta^2 = 0.323$, $p < 0.001$) on the biomarker levels. Between-subject tests revealed that the severity had the greatest impact on MMP3 (partial $\eta^2 = 0.161$, $p = 0.002$). OPN and VEGF demonstrated insignificant effects on the severity of the disease with a very small effect size.

Intercorrelation matrix. The most notable correlations were a significant moderate negative correlation between MMP3 and ACPA ($r = -0.379$, $p < 0.01$). The duration of illness is moderately related to VEGF ($r = 0.325$, $p < 0.01$) and OPN ($r = 0.383$, $p < 0.001$). CRP has a moderate negative correlation with VEGF ($r = -0.357$, $p < 0.01$) (results are not tabulated).

Results of binary logistic regression analysis. The binary logistic regression test recruited HDA state as a dependent variable (and MDA as the reference group) is seen in Table 3. The regression discriminated severity of RA patients and found that MMP3 and OPN substantially discriminated both study groups ($\chi^2 = 20.116$, $df = 3$, $p < 0.001$). The Nagelkerke's effect size was 0.350, and the classification precision was 74.2%, with a sensitivity of 66.7% and a specificity of 81.8%.

Effects of background variables. The univariate GLM analysis was used to assess the impact of medications on the serum levels of the studied parameters in RA patients. The study found no significant effects of naproxen, sulfasalazine, prednisolone, tofacitinib, or methotrexate on the blood levels of the three biomarkers tested. The other medications prescribed have little discernible impact. The cumulative effects of medication administration on the assessed parameters were just minor (partial $\eta^2 = 0.033$) (results are not tabulated).

Results of neural networks. As shown in Table 4, the neural network analysis was used to distinguish between individuals with HDA and MDA. One unit was employed in hidden layer 1, whereas hyperbolic tangent was used as an activation function, identity in the output layer, and sum of squares was used as an error term in the final neural network. Because the testing set had a significantly smaller sum of squares (5.331) and a lower relative error (23.6 percent versus 47.8 percent, respectively), the neural network model was able to generalize the trend. As a result, the holdout set had a 66.7 percent relative inaccuracy. As seen in Table 4, the sensitivity was 88.9%, and the specificity was 68.4%. The cut-off values of the serum biomarkers concentration at the above sensitivity and specificity were: MMP3 ≥ 17.75 ng/ml, VEGF ≥ 124.95 pg/ml, OPN ≥ 3.814 ng/ml. As shown in Figure, the input variables are ranked by relevance and relative importance, MMP3, OPN, and VEGF were the three most important predictors of the model's predictive power.

Table 4. The Results of neural networks with high disease activity (HDA) RA versus moderate disease activity (MDA) as reference group

	Models	HDA vs MDA
Input layer	Number of units	3
	Rescaling method	Normalized
Hidden layers	Number of hidden layers	1
	Number of units in hidden layer 1	3
	Activation Function	Hyperbolic tangent
Output layer	Dependent variables	HDA vs MDA
	Number of units	2
	Activation function	Identity
	Error function	Sum of squares
Training	Sum of squares error term	10.358
	% Incorrect or relative error	23.6%
	Prediction (sensitivity, specificity)	75.0%, 69.6%
Testing	Sum of Squares error	5.331
	% Incorrect or relative error	47.8%
	Prediction (sensitivity, specificity)	88.9%, 68.4%
	AUC ROC	0.81
Holdout	% Incorrect or relative error	66.7%
	Prediction (sensitivity, specificity)	60.0%, 45.5%

Note. AUC ROC: area under the curve of receiver operating curve.

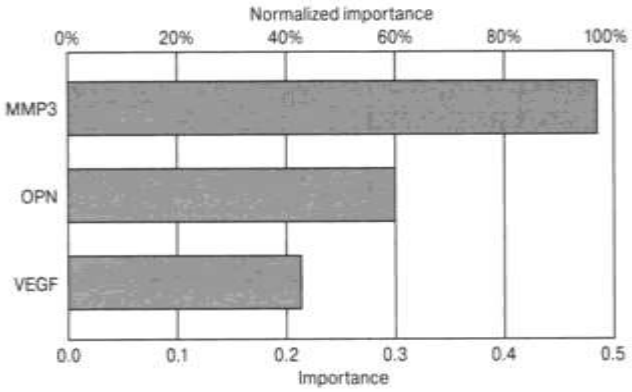


Figure. The importance of the biomarkers for differentiation between severity states of the rheumatoid arthritis patients by neural network analysis

Discussion

The current study's major finding is the elevation in serum MMP3 in RA patients when compared with the control group as seen in Table 1. The increase of MMP3 in RA is in accordance with other previous works [27, 29, 32, 48] that can be attributed to the secretion of MMP3, in higher amounts, from the synovial joints [42]. The contribution of pro-inflammatory cytokines in RA's pathogenesis is widely accepted [16]. Therefore, MMP3 has been proposed as a marker of inflammation in RA [41]. However, at high levels, MMP3 causes increases in the number of osteoclast precursors and osteoclast formation, resulting in inducing bone resorption [5]. Furthermore, MMP3 is correlated with the number of inflamed and painful joints in RA patients [59]. Serum MMP3 may be a possible diagnostic for histological synovitis and RA diagnosis [28], joint erosions in the early stages of the illness, and disease progression monitoring [26, 48]. MMP3 levels in the blood are an excellent predictor of bone damage, and MMP3 inhibition may be a significant treatment approach for individuals with early rheumatoid arthritis [47]. According to recent research, serum MMP3 levels predict clinical remission more accurately than CRP levels [17]. These results prompted several researchers to recommend MMP3 testing as part of a standardized evaluation to go along with RA treatment options [25].

In addition, a neural network method allowed for external validation of the clinical diagnosis of the HDA of RA against MDA with an AUC ROC curve of 0.814 and MMP3 and OPN as the most important discriminatory variable. Macrophage populations in synovial tissue are associated with articular damage, and a decrease in macrophage counts is a sensitive biomarker of therapy response in rheumatoid arthritis patients [56].

The multivariate GLM analysis was performed to estimate the effect of the cofounders on the serum levels of the measured parameters. As seen in Table 2, age and sex had no substantial impact on the levels of the assessed biomarkers. BMI has a slight effect on the variance of the serum level of the measured bone-related cytokines. The levels of biomarkers are substantially altered only by the magnitude of the severity in the RA patients, with a larger effect size (partial $\eta^2 = 0.323$). Tests for between-subject effects showed that 16.1 percent of the difference in the MMP3 concentration was attributed to RA. These analyses were performed to rule out the influence of cofounders on the values of the estimated parameters because there are some reports about the effect of BMI on MMP3 level [4], decreased expression of VEGF with increased patient age [12], and the effect of sex and age on OPN level [21]. However, these correlations were reported in diseases other than RA.

MMP3 is secreted by synovial fibroblasts or B cells, which are well-known MMP3 producers, that are responsible for the large rise in plasma levels [46]. The previously published study demonstrated a tight link between plasma OPN levels and MMP3 levels. Plasma OPN levels decreased considerably in responders after medication [20].

Table 3 showed that the severity of the RA is associated with the plasma level of MMP3. MMP3 is strongly associated with two inflammatory indicators; CRP and ESR [45]. These findings revealed a correlation between the levels of bone-related cytokines and biomarkers of inflammation. Other researchers, however, demonstrated that elevated serum biomarkers could not be a risk factor for reduced bone mineral density [44]. The same reasons apply: the inflammatory state associated with RA is the primary source of biomarker changes. ACPA levels are influenced by serum MMP3 levels. Previously, ACPA was found to have the best predictive importance for the production of RA [38, 51]. A strong association between ACPA positivity and arthritis development has also been established in several patients who later experienced RA [40]. Therefore, the increase in serum MMP3 may enforce the validity and sensitivity of ACPA in the diagnosis of RA in addition to estimating the severity of the RA disease [40].

There is a good predictive value of the serum MMP3 for the severity of RA subjects. MMP3 is a connective tissue biomarker. However, the diagnostic cut-off value is rather high. MMP3 expression is a good indicator of disease activity in people with rheumatoid arthritis [30]. MMP3 levels rose with advanced stage and RA class and gradually dropped following treatment effectiveness [49]. Serum MMP3 levels were shown to be strongly linked with serum CRP, RF levels, and joint damage [26]. Additionally, there was a statistically significant association between MMP3 and CRP, and ESR [17]. Elevated blood MMP3 levels in rheumatoid arthritis patients show inflammation [10, 32] and serve as an early predictor of increasing joint destruction as well as a powerful predictive indicator of rheumatoid

arthritis disease activity [10, 29]. In another study, serum concentrations of MMPs significantly correlated with markers of RA activity such as DAS28 and CRP levels [23].

Recently, it was shown that MMP3 serum levels correspond with the quantity of MMP3 generated by synovial mast cells [19] in inflamed joints, indicating the severity of rheumatoid synovitis [13]. With increasing RA severity, MMP3 and ACPA increase indicating the correlation of both biomarkers with the degree of disease activity [43, 50]. Therefore, the measured biomarkers, especially MMP3 can be used as a potential biomarker for RA activity with acceptable sensitivity and specificity. The main limitation of the current analysis is the limited size of the test sample. To ensure adequate generalization of the study findings, a greater sample size would be needed. The second drawback is the relatively high inter-assay coefficient of variance percent, which was less than 10% for all kits.

Conclusion

There was a significant elevation in the serum level of MMP3 in RA patients with HDA compared to the MDA and control groups. The NN analysis showed that the MMP3 is the most sensitive predictor for RA patients with HDA followed by OPN. In addition to the known high DAS28, RF, CRP, and ACPA in HDA patients, the binary logistic regression showed the potential use of OPN and MMP3 as differentiating factors for HDA from MDA.

References

1. Al-Hakeim H.K., Moustafa S.R., Jasem K.M. Serum cesium, rhenium, and rubidium in rheumatoid arthritis patients. *Biol. Trace Elem. Res., 2019, vol. 189, no. 2, pp. 379–386. doi: 10.1007/s12011-018-1497-5*
2. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham III CO, Birnbaum N.S., Burmester G.R., Bykerk V.P., Cohen M.D. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum., 2010, vol. 62, no. 9, pp. 2569–2581. doi: 10.1136/ard.2010.138461*
3. Anandarajah A.P. Clinical aspects of rheumatoid arthritis: highlights from the 2010 ACR conference. *Int. J. Clin. Rheumatol, 2011, vol. 6, no. 3: 267. doi: 10.2217/IJR.11.39*
4. Boumiza S., Chahed K., Tabka Z., Jacob M.-P., Norel X., Ozen G. MMPs and TIMPs levels are correlated with anthropometric parameters, blood pressure, and endothelial function in obesity. *Scientific Reports, 2021, vol. 11, no. 1: 20052. doi: 10.1038/s41598-021-99577-2*
5. Cessak G., Kuzawinska O., Burda A., Lis K., Wojnar M., Mirowska-Guzel D., Balkowiec-Iskra E. TNF inhibitors — mechanisms of action, approved and off-label indications. *Pharmacol. Rep., 2014, vol. 66, no. 5, pp. 836–844. doi: 10.1016/j.pharep.2014.05.004*
6. Chen G., Zhang X., Li R., Fang L., Niu X., Zheng Y., He D., Xu R., Zhang J.Z. Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum., 2010, vol. 62, no. 10, pp. 2900–2908. doi: 10.1002/art.27603*
7. Chen J.J., Huang J.F., Du W.X., Tong P.J. Expression and significance of MMP3 in synovium of knee joint at different stage in osteoarthritis patients. *Asian Pac. J. Trop. Med., 2014, vol. 7, no. 4, pp. 297–300. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60042-0*
8. Cohen J., Cohen P., West S.G., Aiken L.S. Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences; 3rd edition. *Taylor and Francis, 2013, 536 p.*
9. Cornec D., Varache S., Morvan J., Devauchelle-Pensec V., Berthelot J.M., Le Henaff-Bourhis C., Hoang S., Martin A., Chalès G., Jousse-Joulin S., Saraux A. Comparison of ACR 1987 and ACR/EULAR 2010 criteria for predicting a 10-year diagnosis of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine, 2012, vol. 79, no. 6, pp. 581–585. doi: 10.1016/j.jbspin.2012.01.015*
10. Fadda S., Abolkheir E., Afifi R., Gamal M. Serum matrix metalloproteinase-3 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and joint destruction. *Egyptian Rheumatol., 2016, vol. 38, no. 3, pp. 153–159. doi: 10.1016/j.ejr.2016.01.001*
11. Fahim N.K., Negida A., Fahim A.K. Sample Size Calculation Guide — Part 3: How to calculate the sample size for an independent case-control study. *Adv. J. Emerg. Med., 2019, vol. 3, no. 2: e20. doi: 10.22114/AJEM.v0i0.138*
12. Fane M.E., Ecker B.L., Kaur A., Marino G.E., Alicea G.M., Douglass S.M., Chhabra Y., Webster M.R., Marshall A., Colling R., Espinosa O., Coupe N., Maroo N., Campo L., Middleton M.R., Corrie P., Xu X., Karakousis G.C., Weeraratna A.T. sFRP2 supersedes VEGF as an age-related driver of angiogenesis in melanoma, affecting response to anti-VEGF therapy in older patients. *Clin. Cancer. Res., 2020, vol. 26, no. 21, pp. 5709–5719. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0446*
13. Forootanfar H., Adeli-Sardou M., Nikkhoo M., Mehrabani M., Amir-Heidari B., Shahverdi A.R., Shakibaie M. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *J. Trace Elem. Med. Biol., 2014, vol. 28, no. 1, pp. 75–79. doi: 10.1016/j.jtemb.2013.07.005*
14. Giannini D., Antonucci M., Petrelli F., Bilia S., Alunno A., Puxeddu I. One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol., 2020, vol. 38, no. 3, pp. 387–397.*
15. Gravallese E.M. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J. Clin. Invest., 2003, vol. 112, no. 2, pp. 147–149. doi: 10.1172/JCI19190*
16. Guo X., Wang S., Godwood A., Close D., Ryan P.C., Roskos L.K., White W.I. Pharmacodynamic biomarkers and differential effects of TNF- and GM-CSF-targeting biologics in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis., 2019, vol. 22, no. 4, pp. 646–653. doi: 10.1111/1756-185X.13395*
17. Hattori Y., Kida D., Kaneko A. Normal serum matrix metalloproteinase-3 levels can be used to predict clinical remission and normal physical function in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol., 2019, vol. 38, no. 1, pp. 181–187. doi: 10.1007/s10067-017-3829-9*
18. Horton M.A., Nesbit M.A., Helfrich M.H. Interaction of osteopontin with osteoclast integrins. *Ann. NY Acad. Sci., 1995, vol. 760, pp. 190–200. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44630.x*
19. Hueber A.J., Asquith D.L., Miller A.M., Reilly J., Kerr S., Leipe J., Melendez A.J., McInnes I.B. Cutting edge: mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol., 2010, vol. 184, no. 7, pp. 3336–3340. doi: 10.4049/jimmunol.0903566*

20. Iwadate H., Kobayashi H., Kanno T., Asano T., Saito R., Sato S., Suzuki E., Watanabe H., Ohira H. Plasma osteopontin is correlated with bone resorption markers in rheumatoid arthritis patients. *Int. J. Rheum. Dis., 2014, vol. 17, no. 1, pp. 50–56. doi: 10.1111/1756-185X.12115*
21. Kariuki S.N., Moore J.G., Kirou K.A., Crow M.K., Utset T.O., Niewold T.B. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun., 2009, vol. 10, no. 5, pp. 487–494. doi: 10.1038/gene.2009.15.*
22. Kim H.R., Kim K.W., Kim B.M., Cho M.L., Lee S.H. The effect of vascular endothelial growth factor on osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 4: e0124909. doi: 10.1371/journal.pone.0124909*
23. Klimiuk P.A., Domysławska I., Sierakowski S., Chwiećko J. Regulation of serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 following rituximab therapy in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor blockers. *Rheumatol. Int., 2015, vol. 35, no. 4, pp. 749–755. doi: 10.1007/s00296-014-3112-1*
24. Lee Y.H., Bae S.C. Correlation between circulating VEGF levels and disease activity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Z. Rheumatol., 2018, vol. 77, no. 3, pp. 240–248. doi: 10.1007/s00393-016-0229-5*
25. Lerner A., Neidhofer S., Reuter S., Matthias T. MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., 2018, vol. 32, no. 4, pp. 550–562. doi: 10.1016/j.berh.2019.01.006*
26. Li L., Cai B., Liao J., Yang B., Huang Z., Wang L. [Clinical value of serum matrix metalloproteinase-3 in evaluating joint destruction and therapeutic effect in rheumatoid arthritis patients]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2013, vol. 29, no. 9, pp. 966–969.*
27. Liu M.K., Wang L.C., Hu F.L. [Value of serum matrix metalloproteinase 3 in the assessment of early rheumatoid arthritis]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2018, vol. 50, no. 6, pp. 981–985.*
28. Ma J.-D., Zhou J.-J., Zheng D.-H., Chen L.-F., Mo Y.-Q., Wei X.-N., Yang L.-J., Dai L. Serum matrix metalloproteinase-3 as a noninvasive biomarker of histological synovitis for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Mediat. Inflamm., 2014, vol. 2014: 179284. doi: 10.1155/2014/179284*
29. Ma J., Wang X., Mo Y., Chen L., Zheng D., Wei X., Dai L. [Value of serum matrix metalloproteinase-3 in the assessment of active disease in patients with rheumatoid arthritis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2015, vol. 95, no. 47, pp. 3823–3828.*
30. Ma M.J., Liu H.C., Qu X.Q., Wang J.L. Matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism and its mRNA expression in rheumatoid arthritis. *Genet. Mol. Res., 2015, vol. 14, no. 4, pp. 15652–9. doi: 10.4238/2015.December.1.17*
31. Malemud C.J. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta, 2007, vol. 375, no. 1–2, pp. 10–19. doi: 10.1016/j.cca.2006.06.033*
32. Mamehara A., Sugimoto T., Sugiyama D., Morinobu S., Tsuji G., Kawano S., Morinobu A., Kumagai S. Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J. Med. Sci., 2010, vol. 56, no. 3, pp. E98–107.*
33. Mateen S., Zafar A., Moin S., Khan A.Q., Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta, 2016, vol. 455, pp. 161–171. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.010*
34. Miossec P. Rheumatoid arthritis: still a chronic disease. *Lancet, 2013, vol. 381, no. 9870, pp. 884–886. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62192-8*
35. Mohammed Ali D.M., Al-Fadhel S.Z., Al-Ghuraibawi NHA, Al-Hakeim H.K. Serum chemerin and visfatin levels and their ratio as possible diagnostic parameters of rheumatoid arthritis. *Reumatologia, 2020, vol. 58, no. 2, pp. 67–75. doi: 10.5114/reum.2020.95359*
36. Mu N., Gu J.T., Huang T.L., Liu N.N., Chen H., Bu X., Zheng Z.H., Jia B., Liu J., Wang B.L., Wang Y.M., Zhu Z.F., Zhang Y., Zhang Y.Q., Xue X.C., Li M., Zhang W. Blockade of discoidin domain receptor 2 as a strategy for reducing inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis via altered interleukin-15 and dkk-1 signaling in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol., 2020, vol. 72, no. 6, pp. 943–956. doi: 10.1002/art.41205*
37. Ohshima S., Yamaguchi N., Nishioka K., Mima T., Ishii T., Umeshita-Sasai M., Kobayashi H., Shimizu M., Katada Y., Wakitani S., Murata N., Nomura S., Matsuno H., Katayama R., Kon S., Inobe M., Uede T., Kawase I., Saeki Y. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J. Rheumatol., 2002, vol. 29, no. 10, pp. 2061–2067.*
38. Orr C., Najm A., Biniecka M., McGarry T., Ng C.T., Young F., Fearon U., Veale D.J. Synovial immunophenotype and anti-citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis patients: relationship to treatment response and radiologic prognosis. *Arthritis Rheum., 2017, vol. 69, no. 11, pp. 2114–2123. doi: 10.1002/art.40218*
39. Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007, vol. 8, no. 3, pp. 221–233. doi: 10.1038/nrm2125*
40. Rakieh C., Nam J.L., Hunt L., Hensor E.M., Das S., Bissell L.A., Villeneuve E., McGonagle D., Hodgson R., Grainger A., Wakefield R.J., Conaghan P.G., Emery P. Predicting the development of clinical arthritis in anti-CCP positive individuals with non-specific musculoskeletal symptoms: a prospective observational cohort study. *Ann. Rheum. Dis., 2015, vol. 74, no. 9, pp. 1659–1666. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205227*
41. Ribbens C., Martin y Porras M., Franchimont N., Kaiser M.J., Jaspar J.M., Damas P., Houssiau F.A., Malaise M.G. Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann. Rheum. Dis., 2002, vol. 61, no. 2, pp. 161–166. doi: 10.1136/ard.61.2.161*
42. Sasaki S., Iwata H., Ishiguro N., Obata K., Miura T. Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Rheumatol., 1994, vol. 13, no. 2, pp. 228–233. doi: 10.1007/BF02249017*
43. Schuerwegh A.J., Ioan-Facsinay A., Dorjee A.L., Roos J., Bajema I.M., van der Voort E.I., Huizinga T.W., Toes R.E. Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2010, vol. 107, no. 6, pp. 2586–2591. doi: 10.1073/pnas.0913054107*
44. Sponholtz T.R., Zhang X., Fontes J.D., Meigs J.B., Cupples L.A., Kiel D.P., Hannan M.T., McLean R.R. Association between inflammatory biomarkers and bone mineral density in a community-based cohort of men and women. *Arthritis Care Res. (Hoboken), 2014, vol. 66, no. 8, pp. 1233–1240. doi: 10.1002/acr.22270*
45. Sun S., Bay-Jensen A.-C., Karsdal M.A., Siebuhr A.S., Zheng Q., Maksymowych W.P., Christiansen T.G., Henriksen K. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. *BMC Musculoskelet. Disord., 2014, vol. 15, no. 93, pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2474-15-93*

46. Tetlow L.C., Lees M., Ogata Y., Nagase H., Woolley D.E. Differential expression of gelatinase B (MMP-9) and stromelysin-1 (MMP-3) by rheumatoid synovial cells in vitro and in vivo. *Rheumatol. Int., 1993, vol. 13, no. 2, pp. 53–59. doi: 10.1007/BF00307734*
47. Tokai N., Yoshida S., Kotani T., Yoshikawa A., Kimura Y., Fujiki Y., Matsumura Y., Takeuchi T., Makino S., Arawaka S. Serum matrix metalloproteinase 3 levels are associated with an effect of iguratimod as add-on therapy to biological DMARDs in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One, 2018, vol. 13, no. 8: e0202601. doi: 10.1371/journal.pone.0202601*
48. Tuncer T., Kaya A., Gulkesen A., Kal G.A., Kaman D., Akgol G. Matrix metalloproteinase-3 levels in relation to disease activity and radiological progression in rheumatoid arthritis. *Adv. Clin. Exp. Med., 2019, vol. 28, no. 5, pp. 665–670. doi: 10.17219/acem/94065*
49. Uemura Y., Hayashi H., Takahashi T., Saitho T., Umeda R., Ichise Y., Sendo S., Tsuji G., Kumagai S. [MMP-3 as a biomarker of disease activity of rheumatoid arthritis]. *Rinsho Byori, 2015, vol. 63, no. 12, pp. 1357–1364.*
50. Umeda N., Matsumoto I., Sumida T. [The pathogenic role of ACPA in rheumatoid arthritis]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2017, vol. 40, no. 6, pp. 391–395. doi: 10.2177/jsci.40.391*
51. Van de Stadt L.A., de Koning M.H., van de Stadt R.J., Wolbink G., Dijkmans B.A., Hamann D., van Schaardenburg D. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum., 2011, vol. 63, no. 11, pp. 3226–3233. doi: 10.1002/art.30537*
52. Van Riel P., Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol., 2016, vol. 34, no. 5 (suppl. 101), pp. S4–S40.*
53. Vasilev G., Manolova I., Ivanova M., Stanilov I., Miteva L., Stanilova S. The role of IL-18 in addition to Th17 cytokines in rheumatoid arthritis development and treatment in women. *Sci. Rep., 2021, vol. 11, no. 1: 15391. doi: 10.1038/s41598-021-94841-x*
54. Vickers N.J. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Curr. Biol., 2017, vol. 27, no. 14, pp. R713–R715. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.064*
55. Wasserman A. Rheumatoid arthritis: common questions about diagnosis and management. *Am. Fam. Physician., 2018, vol. 97, no. 7, pp. 455–462.*
56. Wijbrandts C.A., Vergunst C.E., Haringman J.J., Gerlag D.M., Smeets T.J., Tak P.P. Absence of changes in the number of synovial sublining macrophages after ineffective treatment for rheumatoid arthritis: implications for use of synovial sublining macrophages as a biomarker. *Arthritis Rheumatol., 2007, vol. 56, no. 11, pp. 3869–3871. doi: 10.1002/art.22964*
57. Wu J., Li Q., Deng J., Zhao J.J., Yu Q.H. Association between IL-33 and other inflammatory factors in patients with rheumatoid arthritis and in fibroblast-like synoviocytes in vitro. *Exp. Ther. Med., 2021, vol. 21, no. 2: 161. doi: 10.3892/etm.2020.9592*
58. Xu J., Feng Z., Chen S., Zhu J., Wu X., Chen X., Li J. Taxol alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting the formation of microvessels. *Clin. Rheumatol., 2019, vol. 38, no. 1, pp. 19–27 doi: 10.1007/s10067-017-3646-1*
59. Yoshihara Y., Obata Ki, Fujimot N., Yamashita K., Hayakawa T., Shimmei M. Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol., 1995, vol. 38, no. 7, pp. 969–975. doi: 10.1002/art.1780380713*
60. Yumoto K., Ishijima M., Rittling S.R., Tsuji K., Tsuchiya Y., Kon S., Nifuji A., Uede T., Denhardt D.T., Noda M. Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2002, vol. 99, no. 7, pp. 4556–4561. doi: 10.1073/pnas.052523599*
61. Zhang F.-J., Gao S.-G., Cheng L., Tian J., Xu W.-S., Luo W., Song Y., Yang Y., Lei G.-H. The effect of hyaluronic acid on osteopontin and CD44 mRNA of fibroblast-like synoviocytes in patients with osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Int., 2013, vol. 33, no. 1, pp. 79–83. doi: 10.1007/s00296-011-2339-3*
62. Zhang F., Luo W., Li Y., Gao S., Lei G. Role of osteopontin in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int., 2015, vol. 35, no. 4, pp. 589–595. doi: 10.1007/s00296-014-3122-z*
63. Zheng W., Li R., Pan H., He D., Xu R., Guo T.B., Guo Y., Zhang J.Z. Role of osteopontin in induction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1β through the NF-κB and MAPK pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum., 2009, vol. 60, no. 7, pp. 1957–1965. doi: 10.1002/art.24625*

Авторы:

Салех Р.О., отдел медицинской лабораторной техники Университетского колледжа Аль-Маариф, г. Рамади, провинция Аль-Анбар, Ирак;
Махмуд Л.А., Ассистент, Медицинский колледж Университета Анбар, г. Рамади, провинция Аль-Анбар, Ирак;
Мохаммед М.А., Главное управление образования провинции Анбар, Министерство образования, провинция Аль-Анбар, Ирак;
Аль-Рави Х.Ф., профессор, Научный колледж Университета Анбар, г. Рамади, провинция Аль-Анбар, Ирак;
Аль-Хакейм Х.К., профессор, Научный колледж Университета Куфы, г. Куфа, провинция Наджаф, Ирак.

Authors:

Saleh R.O., Medical Laboratory Techniques Department, Al-Maarif University College, Ramadi, Al Anbar Governorate, Iraq;
Mahmood L.A., Assistent Professor, College of Medicine, University of Anbar, Ramadi, Al Anbar Governorate, Iraq;
Mohammed M.A., General Directorate of Anbar Education, Ministry of Education, Al Anbar Governorate, Iraq;
Al-Rawi K.F., PhD, Professor, College of Science, University of Anbar, Ramadi, Al Anbar Governorate, Iraq;
Al-Hakeim H.K., Professor, College of Science, University of Kufa, Kufa, Najaf Governorate, Iraq.

Поступила в редакцию 25.07.2022
Принята к печати 06.08.2022

Received 25.07.2022
Accepted 06.08.2022

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 156–160

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 156–160

ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ У ДЕТЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНУЮ ТЕРАПИЮ

Е.О. Брюхачева, Ю.В. Захарова, Л.Ю. Отдушкина, Т.В. Пьянзова

ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Резюме. Прогресс изучения микробиома у детей и подростков, его влияние на поддержание здоровья рассматривается как одно из наиболее значимых достижений современной медицины. У детей при различных заболеваниях изменяются качественные и количественные показатели микрофлоры кишечного тракта, что служит причиной развития дисбактериоза. Изучение изменений в состоянии микрофлоры кишечника у детей при лечении противотуберкулезными препаратами сохранило свою значимость и актуальность поскольку исследований в этой области недостаточно, что требует более подробного анализа данной проблемы. В представленной статье оценивается состояние микробного биоценоза кишечника детей, получающих противотуберкулезное лечение. Цель исследования: изучить микробный пейзаж толстокишечного содержимого у детей, получающих противотуберкулезную терапию. *Материалы и методы.* В исследовании включены 24 ребенка с установленным диагнозом туберкулеза органов дыхания, получающих лечение в условиях круглосуточного стационара Кузбасского клинического фтизиопульмонологического медицинского центра им. И.Ф. Копыловой. Исследование кишечной микрофлоры проводили количественным бактериологическим методом. Материалом исследования служил кал, забранный в стерильный одноразовый контейнер, который доставляли на базу кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России. *Результаты.* У всех детей, получающих противотуберкулезную терапию, был выявлен дисбиоз с преобладанием микроэкологических нарушений II (41,7%) и III (37,3%) степени. Микробный пейзаж кишечника характеризовался снижением количественного содержания представителей облигатной флоры *Bifidobacterium* spp. у 66,7% детей и *Lactobacillus* spp. у 45,8%, увеличением количества факультативных микроорганизмов — *E. coli* lac+ и *Citrobacter freundii* — у 12,5%. Поддержание полноценной и активной нормобиоты кишечника возможно при обеспечении ее динамического контроля у больных туберкулезом детей во время лечения. Результаты изучения особенностей микробиоты позволяют предположить, что пациенты нуждаются в пробиотической терапии во время лечения туберкулеза. *Выводы.* Микроэкологические нарушения у детей при противотуберкулезной терапии характеризовались снижением количественного содержания представителей облигатной флоры и увеличением количества факультативных микроорганизмов. Также в материале были выделены различные виды грибов рода *Candida.*

Ключевые слова: *микрофлора кишечника у детей, противотуберкулезное лечение, дисбиоз кишечника, туберкулез у детей, микробиота, лактобактерии, бифидобактерии.*

Адрес для переписки:
Брюхачева Екатерина Олеговна
650029, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22А,
ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (3842) 54-56-51.
E-mail: catia.bek@yandex.ru

Contacts:
Ekaterina O. Bryukhacheva
650029, Russian Federation, Kemerovo, Voroshilov str., 22A,
Kemerovo State Medical University.
Phone: +7 (3842) 54-56-51.
E-mail: catia.bek@yandex.ru

Для цитирования:
Брюхачева Е.О., Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Пьянзова Т.В. Характеристика кишечной микрофлоры у детей, получающих противотуберкулезную терапию // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 156–160. doi: 10.15789/2220-7619-COT-2037

Citation:
Bryukhacheva E.O., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Pyanzova T.V. Characteristics of the intestinal microflora in children receiving antituberculosis therapy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 156–160. doi: 10.15789/2220-7619-COT-2037

© Брюхачева Е.О. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-COT-2037

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

CHARACTERISTICS OF THE INTESTINAL MICROFLORA IN CHILDREN RECEIVING ANTI-TUBERCULOSIS THERAPY

Bryukhacheva E.O., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Pyanzova T.V.

Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia

Abstract. The progress in investigating microbiome in children and adolescents as well as its impact on maintaining health is considered one of the most significant achievements of modern medicine. In children with various diseases, the qualitative and quantitative indicators of the intestinal microflora change, which causes the development of dysbiosis. The assessing changes in intestinal microflora in children during treatment with anti- tuberculosis drugs has retained its importance and relevance due to insufficient data in the field, which requires a more detailed understanding of this problem. The presented article assesses the state of gut microbial biocenosis in children receiving anti-tuberculosis treatment. The purpose of the study: to study the microbial landscape of the colonic contents in children receiving anti-tuberculosis therapy. *Materials and methods.* The study included 24 children with verified tuberculosis of the respiratory organs receiving treatment in a 24-hour hospital of the Kuzbass Clinical Phthisiopulmonological Medical Center named after I.F. Kopylova. The study of intestinal microflora was carried out by a quantitative bacteriological method. The material of the study was feces collected in a sterile disposable container, which was delivered to the Department of Microbiology, Immunology and Virology of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Russian Ministry of Health. *Results.* Dysbiosis with predominance of microecological disorders of II (41.7%) and III (37.3%) degrees was detected in all children receiving anti-tuberculosis therapy. The microbial landscape of the intestine was characterized by a decrease in the quantitative content of representatives of the obligate flora *Bifidobacterium* spp. in 66.7% of children and *Lactobacillus* spp. in 45.8%, an increase in the number of facultative microorganisms: *E. coli* lac+ and *Citrobacter freundii* in 12.5%. Maintaining a full-fledged and active intestinal normobiota is possible by ensuring its dynamic control in children with tuberculosis during treatment. The results of studying the characteristics of the microbiota suggest that patients need probiotic therapy during the treatment of tuberculosis. *Conclusion.* Microecological disorders in children with tuberculosis therapy were characterized by a decrease in the quantitative content of representatives of obligate flora and an increase in the number of facultative microorganisms. Also in the material, various types of fungi of the genus *Candida* were identified.

Key words: *intestinal microflora in children, anti-tuberculosis treatment, intestinal dysbiosis, tuberculosis in children, microbiota, lactobacilli, bifidobacteria.*

Введение

В кишечнике здорового человека находится более 300 видов различных микроорганизмов [3]. Кишечная микрофлора за счет своего состава способна оказывать влияние на функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и на формирование иммунитета [7, 12, 14].

У детей при различных заболеваниях, как инфекционных, так и неинфекционных, изменяются качественные и количественные показатели микрофлоры кишечного тракта [4]. Первопричинами дисбактериоза могут быть: заболевания органов пищеварения, перенесенные острые кишечные инфекции, длительный прием антибактериальных препаратов, диеты и стрессовые ситуации [2, 5]. Клиническую картину дисбаланса кишечной микрофлоры можно узнать по таким жалобам как метеоризм, чувство тяжести в животе, боль, неустойчивый стул [1]. При нарушении микробиоты снижается иммунная защита, в том числе и в отношении туберкулезной инфекции [10, 13]. Также в литературе имеются данные о негативном воздействии на микрофлору кишечника противотуберкулезных препаратов (ПТП), способных вызвать глубокий и стойкий дисбиоз [8, 9, 11].

Изучение изменений в состоянии микрофлоры кишечника у детей при лечении противотуберкулезными препаратами сохранило свою значимость и актуальность, поскольку исследований в этой области недостаточно, они противоречивы или выполнены без учета режима противотуберкулезной терапии.

Цель исследования: изучить микробный пейзаж толстокишечного содержимого у детей, получающих противотуберкулезную терапию.

Материалы и методы

В исследование включены 24 ребенка, которые получали лечение в Кузбасском клиническом фтизиопульмонологическом медицинском центре им. И.Ф. Копыловой. Пациенты в возрасте от 9 до 17 лет включительно, без сопутствующей ВИЧ-инфекции. Гендерный состав представлен 15 (62,5%) девочками и 9 (37,5%) мальчиками, средний возраст — 12,5 (10,75; 16,25) лет. Среди клинических форм преобладали инфильтративный туберкулез — у 9 (37,5%) детей и туберкулез внутригрудных лимфатических узлов — у 8 (33,3). Реже встречался очаговый туберкулез — у 4 (16,7%) детей, туберкулезный плеврит — у 2 (8,3%), диссеми-

нированный туберкулез легких — у 1 (4,2%) пациента. Дети получали лечение по IV, V режиму химиотерапии (ХТ), среднее количество полученных доз — 78 (27,0; 121,0).

Исследование кишечной микрофлоры проводили количественным бактериологическим методом. Материалом исследования служил кал, забранный в стерильный одноразовый контейнер, который доставляли в бактериологическую лабораторию кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России. Разведения осуществлялись в стерильном физиологическом растворе, определяли pH, выполняли посевы на селективные и дифференциально-диагностические среды. Биохимические свойства изучали при помощи коммерческих тест-систем АНАЭРО-TEST 23 (Lachema Diagnostica s.r.o., Чехия), STAPHYtest 16 (Lachema Diagnostica s.r.o., Чехия), ENTEROtest 24 (Lachema Diagnostica s.r.o., Чехия), AUXOCOLOR (BioRad, Франция). Результаты интерпретировали на основании региональных норм и отраслевого стандарта [6].

Результаты

По данным бактериологического исследования у всех пациентов наблюдались нарушения микрофлоры кишечника. Дисбиотические нарушения III степени отмечались у 9 (37,5%) детей, II степени — у 10 (41,7%) человек, I степени — у 5 (20,8%) больных. Состав представителей микрофлоры кишечника у детей с туберкулезом органов дыхания представлен в таблице.

У 16 (66,7%) пациентов выявлено снижение количества представителей рода *Bifidobacterium* spp., по сравнению с едиными нормами. Также выявлено снижение количества *Lactobacillus* spp. у 11 (45,8%) пациентов. *Clostridium* и *Klebsiella* и *Proteus* в 95,8% обнаруживались в титрах, не превышающих значения нормы. Среди условно-патогенных бактерий преобладали представители семейства *Enterobacteriaceae*, увеличение лактозоположительной кишечной палочки встречалось у 3 (12,5%) детей, а снижение — у 5 (20,8%) пациентов. Количественный уровень лактозоотрицательных и гемолизинпродуцирующих кишечных палочек у 95,8% пациентов соответствовал норме. Кокковая условно-патогенная микрофлора была представлена бактериями рода *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Среди стафилококков были выявлено увеличение *S. simulans, S. lentus, S. epidermidis*, а количество *S. aureus* соответствовало нормам. Содержание энтерококков было снижено у 13 (54,2%) детей, были идентифицированы *E. faecalis, E. faecium*. О нарушениях в составе микрофлоры свидетельствует появление *Providencia rettgeri* до 3×10^5 (4,2%), *Citrobacter*

Таблица. Состав микрофлоры кишечника детей с туберкулезом

Table. Composition of intestinal microflora of tuberculosis patients

Группа Group	**Представители микрофлоры** Representatives of microflora	**Полученное значение, lg КОЕ/г** Value obtained, lg CFU/g	**Норма, lg КОЕ/г** Norm, lg CFU/g	**Результат** Result
		Me (Q_{25}; Q_{75}) Me (Q_{25}; Q_{75})	**Me (Q_{25}; Q_{75})** Me (Q_{25}; Q_{75})	
Облигатная анаэробная микрофлора Obligate anaerobic microflora	***Bifidobacterium* spp.**	7,0 (7; 9)	9,5 (9;10)	↓
	***Lactobacillus* spp.**	7,0 (6; 8)	7,5 (7; 8)	↓
Факультативная Грам– микрофлора Facultative Gram– microflora	***E. coli* lac+**	8,0 (6; 8)	7,5 (7; 8)	↑
	***E. coli* lac–**	4,0 (4; 4)	3 (2; 4)	**Норма** Norm
	***E. coli* hly+**	4,0 (4; 4)	3 (2; 4)	**Норма** Norm
	Другие условно-патогенные энтеробактерии Other opportunistic enterobacteria	4,0 (4; 5)	3 (2; 4)	↑
Факультативная Грам+ микрофлора Facultative Gram+ microflora	***Enterococcus* spp.**	5,0 (4; 6)	6,5 (6; 7)	↓
	S. epidermidis	2,0 (2; 4)	4 (3; 5)	↓
	***Streptococcus* spp. hly+**	4,0 (4; 4)	3 (2; 4)	**Норма** Norm
Грибы Yeast	***Candida***	4,0 (2,75; 5)	3 (2; 4)	↑

Примечание. lg КОЕ/г — логарифм колониеобразующих единиц на грамм материала, Me — медиана.
Note. lg CFU/g — logarithm of colony forming units per gram of material, Me — median.

freundii до 4×10^6 (12,5%), *Citrobacter diversus* до 3×10^6 (4,2%), *Enterobacter agglomerans* до 1×10^8 (4,2%), *Hafnia alvei* до 6×10^6 (4,2%).

Грибы рода *Candida* обнаружены в кишечном содержимом у 16 (66,7%) детей. Видовая структура грибов представлена на рисунке. Установлено существенное преобладание *C. albicans.* При исследовании pH материала наблюдалась слабокислая реакция с Me 6,5 (6,0; 6,63), что может свидетельствовать об активации патогенной микрофлоры и сбоях в работе ферментативной системы.

Как и в литературных данных [9, 11], было выявлено негативное воздействие ПТП на микрофлору кишечника, однако впервые было рассмотрено такое влияние у детей, получающих терапию по IV и V режимам с включением препаратов, входящих в данные схемы. Факторы, обусловливающие развитие дисбиоза, многообразны. Прежде всего, причиной его развития может явится использование антибактериальных препаратов для лечения туберкулеза. Наличия заболевания туберкулезом создает предпосылки для возникновения выраженных нарушений микробиоценоза. Дисбиотическое состояние усугубляют нарушения иммунной системы, способствуя затяжному течению заболевания туберкулезом и развитию осложнений у детей.

Таким образом, поддержание полноценной и активной нормобиоты кишечника возможно при обеспечении ее динамического контроля у больных туберкулезом детей во время лечения по IV, V режиму ХТ. Результаты изучения

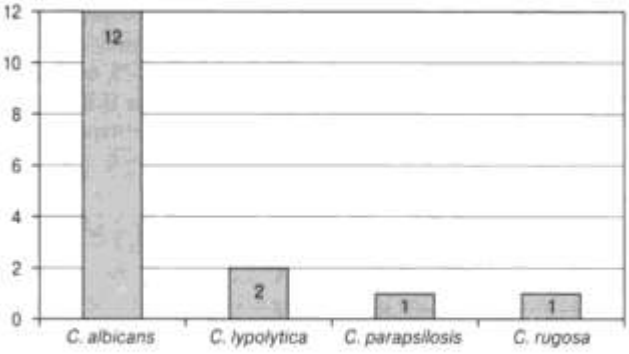


Рисунок. Характеристика структуры выделенных грибов рода *Candida* в кишечном биотопе пациентов

Figure. Characteristics of the pattern of isolated *Candida* genus in the intestinal biotope of the patients

особенностей микробиоты позволяют предположить, что пациенты нуждаются в пробиотической терапии во время лечения туберкулеза. Исследованиями различных авторов установлено, что при лечении кишечного дисбактериоза предпочтение отводится бифидосодержащим препаратам, которые обладают свойством восстанавливать данные звенья микробиоценоза [4, 8]. Это обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований по изучению возможностей профилактики и коррекции нарушений кишечной микрофлоры у детей, получающих терапию в связи с туберкулезом со множественной лекарственной устойчивостью.

Список литературы/References

1. Голошубина В.В., Трухан Д.И., Багишева Н.В. Нарушения кишечного микробиоценоза: актуальные аспекты терминологии, клиники, профилактики // Русский медицинский журнал. 2020. Т. 28, № 12. С. 17–22. [Goloshubina V.V., Trukhan D.I., Bagisheva N.V. Intestinal microbiocenosis disorder: current aspects of terminology, clinical picture and prevention. *Russkij medicinskij zhurnal = Russian Medical Journal, 2020, vol. 28, no. 12, pp. 17–22. (In Russ.)*]
2. Демидова Е.С. Патогенетические аспекты дисбактериоза и принципы лечения // Авиценна. 2021. № 91. С. 6–7. [Demidova E.S. Pathogenetic aspects of dysbacteriosis and principles of treatment. *Avitsenna = Avicenna, 2021, no. 91, pp. 6–7. (In Russ.)*]
3. Дусмагамбетова А.М., Дусмагамбетов М.У., Жусупов Б.З. Значение грамположительных кокков в развитии дисбактериоза кишечника // American Scientific Journal. 2020. № 43. С. 21–23. [Dusmagambetova A.M., Dusmagambetov M.U., Zhusupov B.Z. The significance of gram-positive cocci in the development of intestinal dysbiosis. *American Scientific Journal, 2020, no. 43, pp. 21–23. (In Russ.)*]
4. Едгорова Н.Т. Изучение состояния микрофлоры кишечника у детей при дисбактериозе (Республика Узбекистан) // International scientific review of the problems of natural sciences and medicine : Collection of scientific articles IX International correspondence scientific specialized conference, Boston, USA, 03 февраля 2019 года. Boston, USA: Problems of Science, 2019. С. 58–64. [Edgorova N.T. Study of the state of intestinal microflora in children with dysbacteriosis (Republic of Uzbekistan). International scientific review of the problems of natural sciences and medicine: Collection of scientific articles IX International correspondence scientific specialized conference, Boston, USA, February 03, 2019. *Boston, USA: Problems of Science, 2019, pp. 58–64. (In Russ.)*]
5. Лазебник Л.Б. Инновации в коррекции кишечных дисбиозов различного генеза // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. 2018. Т. 2, № 7. С. 2–6. [Lazebnik L.B. Innovations in the correction of intestinal dysbiosis of various origins. *Russkij medicinskij zhurnal. Meditsinskoe obozrenie = Russian Medical Journal. Medical review, 2018, vol. 2. no. 7, pp. 2–6. (In Russ.)*]
6. Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»: приказ МЗ РФ № 231 от 9 июня 2003 г. [Approval of the industry standard "Protocol of patient management. Intestinal dysbacteriosis": order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 231. June 9, 2003. *(In Russ.)*] *URL: https://docs.cntd.ru/document/1200119089*
7. Пузанов В.А., Комиссарова О.Г., Никоненко Б.В. Бактериальная микробиота нижних отделов кишечника и бронхов у больных туберкулезом // Туберкулез и болезни легких. 2020. Т. 98, № 5. С. 37–43. [Puzanov V.A., Komissarova O.G., Nikonenko B.V. Bacterial microbiota of lower gut and bronchi in tuberculosis patients. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases, 2020, vol. 98, no. 5, pp. 37–43. (In Russ.)*] *doi: 10.21292/2075-1230- 2020-98-5-37-43*

8. Холодов А.А. Характеристика кишечного микробиоценоза больных туберкулезом с различным ВИЧ статусом // Scientist. 2022. Т. 21, № 3. С. 40–43. [Kholodov A.A. Characteristics of the intestinal microbiocenosis of tuberculosis patients with different HIV status. *Scientist, 2022, vol. 21, no. 3, pp. 40–43. (In Russ.)*]
9. Холодов А.А., Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Пьянзова Т.В. Факторы риска развития диспептического синдрома у пациентов фтизиатрического стационара и состояние микрофлоры кишечника больных до начала противотуберкулезной терапии // Туберкулез и болезни легких. 2022. Т. 100, № 4. С. 46–51. [Kholodov A.A., Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Pyanzova T.V. Risk factors of dyspeptic syndrome in patients staying in a tuberculosis in-patient unit and the state of intestinal microflora of patients before the start of anti-tuberculosis therapy. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases, 2022, vol. 100, no. 4, pp. 46–51. (In Russ.)*] *doi: 10.21292/2075-1230-2022-100-4-46-51*
10. Dumas A., Corral D., Colom A., Levillain F., Peixoto A., Hudrisier D., Poquet Y., Neyrolles O. The host microbiota contributes to early protection against lung colonization by Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol., 2018, vol. 9: 2656. doi: 10.3389/fimmu.2018.02656*
11. Eribo O.A., du Plessis N., Ozturk M., Guler R., Walzl G., Chegou N.N. The gut microbiome in tuberculosis susceptibility and treatment response: guilty or not guilty? *Cell. Mol. Life Sci., 2020, vol. 77, no. 8, pp. 1497–1509. doi: 10.1007/s00018-019-03370-4*
12. Ferretti P., Pasolli E., Tett A., Asnicar F., Gorfer V., Fedi S., Armanini F., Truong D.T., Manara S., Zolfo M., Beghini F., Bertorelli R., De Sanctis V., Bariletti I., Canto R., Clementi R., Cologna M., Crifò T., Cusumano G., Gottardi S., Innamorati C., Masè C., Postai D., Savoi D., Duranti S., Lugli G.A., Mancabelli L., Turroni F., Ferrario C., Milani C., Mangifesta M., Anzalone R., Viappiani A., Yassour M., Vlamakis H., Xavier R., Collado C.M., Koren O., Tateo S., Soffiati M., Pedrotti A., Ventura M., Huttenhower C., Bork P., Segata N. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell. Host Microbe, 2018, vol. 24, no. 1, pp. 133–145.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.06.005*
13. Khan N., Mendonca L., Dhariwal A., Fontes G., Menzies D., Xia J., Divangahi M., King I.L. Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol., 2019, vol. 12, no. 3, pp. 772–783. doi: 10.1038/s41385-019-0147-3*
14. Stewart C.J., Ajami N.J., O'Brien J.L., Hutchinson D.S., Smith D.P., Wong M.C., Ross M.C., Lloyd R.E., Doddapaneni H., Metcalf G.A., Muzny D., Gibbs R.A., Vatanen T., Huttenhower C., Xavier R.J., Rewers M., Hagopian W., Toppari J., Ziegler A.G., She J.X., Akolkar B., Lernmark A., Hyoty H., Vehik K., Krischer J.P., Petrosino J.F. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature, 2018, vol. 562, no. 7728, pp. 583–588. doi: 10.1038/s41586-018-0617-x*

Авторы:

Брюхачева Е.О., аспирант кафедры фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;
Захарова Ю.В., д.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;
Отдушкина Л.Ю., ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;
Пьянзова Т.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия.

Authors:

Bryukhacheva E.O., PhD Candidate, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;
Zakharova Yu.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;
Otdushkina L.Yu., Assistant Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;
Pyanzova T.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.09.2022
Принята к печати 11.02.2023

Received 23.09.2022
Accepted 11.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 161–166

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 161–166

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ В УСЛОВИЯХ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КРЫС

С.В. Скупневский, Е.Г. Пухаева, А.К. Бадтиев, Ф.К. Руруа, Ф.Э. Батагова, Ж.Г. Фарниева

Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», г. Владикавказ, Россия

Резюме. Центральная роль митохондрий в процессах энергообеспечения и реализации клеточной смерти делает указанные органеллы одним из перспективных объектов исследования патогенеза иммуновоспалительных заболеваний. Цель: изучить особенности патогенеза в условиях адъювант-индуцированной аутоиммунной патологии на фоне митохондриальных нарушений у крыс. *Материалы и методы.* Крысы линии Wistar, разделенные на группы негативного контроля (растворитель), позитивного контроля (однократное подкожное введение полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) из расчета 0,1 мл/200 г веса), опытную (введение ПАФ 0,1 мл/200 г веса и через 5 недель купризон 0,2% по массе от корма). По окончании эксперимента (7 недель) животных тестировали в модели «открытое поле», усыпляли и проводили забор биоматериала для определения массовых коэффициентов внутренних органов, гематологических и гистологических исследований. Рассчитывали среднее, стандартную ошибку среднего; сравнение гипотез проводили по парному критерию Стьюдента. *Результаты.* В условиях нарушения иммунологической толерантности у крыс выявлен резко сниженный набор массы тела за исследуемый период (негативный контроль +74,7 г, позитивный контроль +10,3 г), на фоне модельной дисфункции митохондрий отмечено общее снижение массы на 6,7 г. Значения массовых коэффициентов свидетельствуют об относительной редукции массы печени, почек, селезенки и тимуса у экспериментальных животных. Количество лейкоцитов ($\times 10^9$/л): негативный контроль — 8,68±0,37, позитивный контроль — 10,98±1,03 ($p < 0,05$), опыт — 12,28±0,63 ($p < 0,001$). В лейкоцитарной формуле и красном ростке существенных изменений не выявлено. На фоне модельной аутоиммунной патологии количество тромбоцитов увеличилось на 22,5% ($p < 0,05$), а в условиях введения купризона — снизилось на 6,3% (относительно негативного контроля). Митохондриальная дисфункция явилась причиной резкого снижения двигательной активности у крыс: количество пересеченных секторов у животных позитивного контроля составило 55,50±6,91, у опытных — 44,50±3,60 (при сравнении между группами $p < 0,001$). Позитивный контроль: в селезенке выявлено разрастание лимфатических узелков, просветление герминативных центров, уплотнение стенок пульпарных и центральных артерий; в красной пульпе обнаруживались единичные очаги кровоизлияний. Опыт: различная по степени выраженности атрофия лимфоидных фолликулов (относительно группы негативного и позитивного контролей), в красной пульпе многочисленные очаги кровоизлияний с гемосиде-

Адрес для переписки:
Пухаева Елена Георгиевна
362025, Россия, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 47,
Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН.
Тел.: 8 (928) 491-16-91.
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

Contacts:
Elena G. Pukhaeva
362025, Russian Federation, RNO-Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaya str., 47, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS.
Phone: +7 (928) 491-16-91.
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

Для цитирования:
Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадтиев А.К., Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г. Особенности развития аутоиммунной патологии в условиях митохондриальной дисфункции у крыс // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 161–166. doi: 10.15789/2220-7619-TFO-2038

Citation:
Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G. The features of developing rat autoimmune pathology with mitochondrial dysfunction // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 161–166. doi: 10.15789/2220-7619-TFO-2038

© Скупневский С.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TFO-2038

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

розом. *Заключение.* Дисфункция митохондрий сопровождается усилением патогенетических признаков аутоиммунной патологии, что может служить одним из ключей к пониманию механизмов развития заболеваний иммунной системы.

Ключевые слова: *адъювант Фрейнда, аутоиммунный ревматоидный артрит, иммунопатологический процесс, купризон, механизм аутоиммунной патологии, митохондриальная дисфункция.*

THE FEATURES OF DEVELOPING RAT AUTOIMMUNE PATHOLOGY WITH MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G.

Institute of Biomedical Investigations — the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation

Abstract. The central role of the mitochondria in energy supply and cell death determines highlight these organelles as one of the promising objects for investigating pathogenesis of immune-mediated inflammatory disorders. The aim: to study features of pathogenesis in rat adjuvant-induced autoimmune pathology separately and in combination with mitochondrial disorders. *Materials and methods.* Wistar rats were divided into groups of negative control (solvent), positive control (single subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant (CAF) at dose of 0.1 ml/200 g body weight), experimental (CAF 0.1 ml/200 g body weight and 5 weeks later — with cuprizone 0.2% per feed weight). At the end of experiment (7 weeks), animals were tested in the "open field" model, euthanized, and biomaterial was collected to measure the relative mass coefficients of internal organs, hematological and histological studies. We calculated the mean, standard error of the mean; comparison of hypotheses was carried out by paired Student's t-test. *Results.* In case of impaired immunological tolerance there was detected reduced rat body weight gain during the study period (negative control +74.7 g, positive control +10.3 g) along with modelled mitochondrial dysfunction, a general decrease in weight by 6.7 g was noted. The magnitude of mass coefficients indicate a relative reduction in mass of liver, kidneys, spleen and thymus in experimental animals. The leukocyte counts ($\times 10^9$/L) are as follows: negative control — 8.68±0.37, positive control — 10.98±1.03 ($p < 0.05$), experimental group — 12.28±0.63 ($p < 0.001$). No significant changes were found in the leukocyte formula and the red cell lineage. During modelled autoimmune pathology, platelet count increased by 22.5% ($p < 0.05$), whereas after cuprizone was administered it decreased by 6.3% (relative to the negative control). Mitochondrial dysfunction caused an abrupt decrease in motor activity in rats: the number of crossed sectors in positive control animals was 55.50±6.91, experimental group — 44.50±3.60 (inter-group comparison, $p < 0.001$). Positive control: enlarged lymphatic nodules were found in the spleen, germinal center clarification, wall thickening of the pulpal and central arteries; single foci of hemorrhages in the red pulp. Experimental group: atrophy of lymphoid follicles of varying severity (relative to the groups of negative and positive controls), numerous foci of hemorrhages with hemosiderosis in the red pulp. *Conclusion.* Mitochondrial dysfunction is accompanied by augmented pathogenetic signs of autoimmune pathology, which can serve as one of the keys to understanding the mechanisms of human autoimmunity.

Key words: *autoimmune rheumatoid arthritis, cuprizone, Freund's adjuvant, immunopathological process, mechanism of autoimmune pathology, mitochondrial dysfunction.*

Введение

Интерес к изучению митохондрий в патогенезе аутоиммунных заболеваний обусловлен их центральной ролью в реализации механизмов клеточной смерти и в поддержании энергетического баланса, который резко изменяется после активации клеток иммунной системы. В работе [4] отмечается, что иммунная стимуляция приводит к высоким энергетическим затратам, в лимфоцитах кардинальным образом перестраивается метаболическая программа и происходит переход от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу. Результатом перепрограммирования является 10–100-кратный выигрыш в скорости наработки АТФ [1], что позволяет осуществлять эффективную пролиферацию, дифференцировку и клональную экспансию клеток.

Митохондрии могут выступать триггерами в реакциях иммунного ответа, поскольку содержащиеся в них N-формильные пептиды и неметилированные CpG-сайты митохондриальной ДНК воспринимаются как чужеродные паттерн-распознающими рецепторами системы врожденного иммунитета, играя роль аларминов или DAMP (damage-associated molecular pattern) [2]. В этой связи в основе одного из механизмов формирования порочных кругов в патогенезе аутоиммунных заболеваний может лежать выход в кровь компонентов митохондриального матрикса вследствие иммуновоспалительных процессов, обусловливающих нарушение целостности клеточных мембран.

В работе [3] авторы отмечают, что немаловажную роль в функционировании иммунной системы играют активные формы кислорода (АФК). В частности, вырабатываемые в мито-

хондриях АФК выступают в качестве мессенджеров, обеспечивают активацию основных иммунокомпетентных клеток, продукцию провоспалительных цитокинов и влияют на течение воспалительной реакции [3, 7]. Реакции адаптивного иммунитета, включая регуляцию функций Т-лимфоцитов, также протекают при участии АФК, вырабатываемых в митохондриях [6]. Нарушение окислительно-восстановительного баланса и избыточное производство АФК может выступать в качестве одной из ведущих причин возникновения аутоиммунных заболеваний [8]. Углубление знаний о роли митохондрий в этиопатогенезе иммунной системы может помочь раскрыть причинно-следственные связи в механизме заболеваний, объединяемых в иммуновоспалительный континуум, и открыть новые перспективы для таргетной терапии.

Цель — изучить особенности патогенеза в условиях адъювант-индуцированной аутоиммунной патологии на фоне митохондриальных нарушений.

Материалы и методы

Исследования проведены на самцах крыс линии Wistar с исходной массой тела 242±8 г. Животных приобретали в ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово». Доступ к воде и пище *ad libitum*. Все животные были рандомизировано разделены на 3 группы по 6 особей в каждой. Первая: негативный контроль — введение растворителей; вторая: позитивный контроль — однократное подкожное введение полного адъюванта Фрейнда (Difco Laboratories) из расчета 0,1 мл на 200 г массы тела; третья: опыт — введение ПАФ по схеме, аналогичной для группы № 2, а с пятой недели кормление предварительно измельченными гранулами экструдированного корма, содержащего 0,2% по массе купризона. По окончании эксперимента (7 недель) животных усыпляли в CO_2-боксе и из сердца отбирали кровь для гематологического анализа (Abacus Vet 5, Diatron, Венгрия).

В течение всего эксперимента еженедельно велся мониторинг массы тела животных, а перед его завершением крыс тестировали в модели «открытое поле» (ООО «НПК Открытая наука», Россия) в течение 3 мин. Регистрировали общую двигательную активность (пересечение секторов всеми лапами), общую вертикальную двигательную активность (стойки с опорой и без нее), количество обнюхиваний/заглядываний в норку.

После эвтаназии животных вскрывали и определяли массу органов: печени, почек, селезенки и тимуса. Массовые коэффициенты рассчитывали исходя из веса животных. Селезенку помещали в 10% нейтральный раствор формалина и подвергали гистологической проводке после предварительной фиксации в течение 72 ч. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали при увеличении 10×20 с помощью системы визуализации Evos 7000 (Thermo Fisher Scientific).

При работе с грызунами придерживались правил и этических норм, описанных в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 г.) и с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН.

Статистическую обработку проводили в программе Excel, рассчитывая среднее значение и стандартную ошибку среднего (M±m). Сравнение гипотез осуществляли по парному критерию Стьюдента. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение животным ПАФ, представляющего собой водно-масляную эмульсию, содержащую в своем составе термически инактивированные бактерии *M. tuberculosis*, сопровождалось нарушением иммунной толерантности и развитием аутоиммунной патологии. Ее следствием явилось снижение массы тела экспериментальных животных, которое более ярко проявилось у крыс, получавших митохондриальный токсикант — купризон [9] (табл.).

Прирост массы за экспериментальный период у интактных животных происходил равномерно, в среднем +12,6 г за неделю. Введение ПАФ привело к резкому сокращению набора массы — в первые пять недель до +2,8 г, а затем выявилась отрицательная динамика −1,0 г в группе позитивного контроля и −6,3 г в опытной группе, которая начала получать с кормом хелатор ионов меди, служащей кофактором цитохром-с-оксидазы [10]. Конечным следствием нарушения энергопродукции в митохондриях явилась более резкая потеря массы у крыс опытной группы по сравнению с животными позитивного контроля. Анализ значений массовых коэффициентов показал, что на фоне формируемой патологии произошло относительное уменьшение массы жизненно важных органов, выполняющих метаболическую, выделительную и иммунную функцию.

Адъювант-индуцированный аутоиммунный воспалительный процесс сопровождался достоверным повышением уровня лейкоцитов в крови. При этом важно подчеркнуть, что на фоне купризона выраженность реакций

Таблица. Результаты клинико-лабораторных исследований и поведенческих реакций животных
Table. Results of laboratory studies and behavioral reactions of animals

Анализируемый параметр Analyzed parameter	**Стат. показатели** Stat. indicators	**Негативный контроль** Negative control	**Позитивный контроль** Positive control	**Опыт** Experiment
Масса тела, г/Body weight, g				
Изменение (7 нед.) Change (7 weeks)		+74,70	+10,30	–6,70
Массовые коэффициенты/Mass coefficients				
Печень Liver	M±m	38,70±2,31	32,50±0,37	31,80±0,85
	p		$< 0,05^{*}$	$< 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Почки Kidneys	M±m	6,78±0,30	6,13±0,07	6,41±0,19
	p		$> 0,05^{*}$	$> 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Селезенка Spleen	M±m	2,73±0,51	2,55±0,18	2,55±0,15
	p		$> 0,05^{*}$	$> 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Тимус Thymus	M±m	1,05±0,07	1,10±0,19	1,01±0,12
	p		$> 0,05^{*}$	$> 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Гематологические показатели/Hematological parameters				
Лейкоциты, $\times 10^9$/л Leukocytes, $\times 10^9$/L	M±m	8,68±0,37	10,98±1,03	12,28±0,63
	p		$< 0,05^{*}$	$< 0,001^{**}$ $> 0,05^{***}$
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л Erythrocytes, $\times 10^{12}$/L	M±m	8,60±0,17	8,93±0,19	9,12±0,20
	p		$> 0,05^{*}$	$> 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	M±m	14,54±0,14	15,28±0,30	14,88±0,32
	p		$< 0,001^{*}$	$> 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Тромбоциты, $\times 10^9$/л Platelets, $\times 10^9$/L		511,33±52,99	626,50±33,19	479,00±29,49
			$< 0,05^{*}$	$> 0,05^{**}$ $> 0,05^{***}$
Поведенческие параметры/Behavioral parameters				
Горизонтальная двигательная активность Horizontal movement	M±m	104±9,00	55,50±6,91	44,50±3,60
	p		$< 0,001^{*}$	$< 0,001^{**}$ $< 0,001^{***}$
Вертикальная двигательная активность Vertical motor activity	M±m	37,33±8,03	15,50±0,96	15,83±2,29
	p		$< 0,01^{*}$	$< 0,01^{**}$ $> 0,05^{***}$
Обнюхивание отверстий Hole sniffing	M±m	17,50 ±0,74	12,00±1,32	5,00±0,97
			$< 0,01^{*}$	$< 0,001^{**}$ $< 0,001^{***}$

Примечание. Сравнение между: * — негативным и позитивным контролями; ** — негативным контролем и опытом; *** — позитивным контролем и опытом.
Note. Comparison between: * — negative and positive controls; ** — negative control and experiment; *** — positive control and experiment.

со стороны клеточного звена иммунной системы оказалась выше. Значительных различий в лейкоцитарной формуле контрольных и экспериментальных групп не выявлено: лимфоциты определялись в диапазоне 63–65%, моноциты — 3–4%, нейтрофилы — 31–34%. Различия между крайними значениями для эритроцитов не превысили 6%, а статистическая проверка гипотезы показала, что все средние значения принадлежат к одной совокупности. При этом качественный состав эритроцитов изменялся незначительно: пределами цветового показателя служили значения 0,49–0,51. Наиболее выраженные сдвиги затронули мегакариоцитарный росток: количество кровяных пластинок у животных позитивного контроля увеличилось на 22,5% относительно негативного контроля, а в опытной — наоборот, уменьшилось на 6,3%. Последнее обстоятельство может объясняться дефектами в работе тромбоцитарных митохондрий и сокращением времени их жизни и циркуляции в кровяном русле.

Значительным изменениям подверглись характер и структура поведения экспериментальных животных. Снижение общей локомоторной активности может быть объяснено одним из проявлений ПАФ — индукцией и последующим развитием аутоиммунного ревматоидного артрита [5]. В этом аспекте двигательные паттерны могут быть использованы в качестве чувствительного индикатора, отражающего течение и глубину системного воспалительного процесса. Здесь также проявилась общая закономерность: объем двигательной активности и выраженность исследовательского рефлекса у животных с митохондриальной патологией снизился, а различия между опытной группой и позитивным контролем оказались статистически значимыми.

Изменения, затронувшие один из органов иммунной системы, — селезенку, отражены на рисунке (вклейка, с. I).

Во всех случаях гистоархитектоника селезенки не нарушена. Ткани животных из группы негативного контроля характеризовались нормальным строением всех структурно-функциональных зон; в отдельных случаях выявлялся венозный застой. Для животных позитивного контроля характерным оказалось разрастание лимфатических узелков, просветление герминативных центров, уплотнение стенок пульпарных и центральных артерий; в красной пульпе обнаруживались единичные очаги кровоизлияний. Степень дистрофических изменений от умеренной до выраженной. На гистологических препаратах у крыс опытной группы в качестве характерных признаков можно отметить различную по выраженности атрофию лимфоидных фолликулов (относительно группы негативного и позитивного контролей), в красной пульпе многочисленные очаги кровоизлияний с гемосидерозом; синусы расширены. Спектр дистрофических изменений — от выраженной до тяжелой степени.

Таким образом, усугубление течения аутоиммунной патологии на фоне дисфункции митохондрий позволяет выделить их в качестве одного из ключевых звеньев в механизме иммунно-воспалительных заболеваний, а разработка высокоэффективной терапии должна включать восстановление и поддержание энергетического баланса организма.

Список литературы/References

1. Будихина А.С., Пащенков М.В. Роль гликолиза в иммунном ответе // Иммунология. 2021. Т. 42, № 1. С. 5–20. [Budikhina A.S., Pashchenkov M.V. The role of glycolysis in the immune response. *Immunologiya = Immunologiya, 2021, vol. 42, no. 1. pp. 5–20. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-1-5-20*
2. Григорьев Е.В., Салахов Р.Р., Голубенко М.В., Понасенко А.В., Шукевич Д.Л., Матвеева В.Г., Радивилко А.С., Цепокина А.В., Великанова Е.А., Корнелюк Р.А., Ивкин А.А. Митохондриальная ДНК как кандидатный DAMP при критических состояниях // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18, № 3. С. 134–143. [Grigor'ev E.V., Salakhov R.R., Golubenko M.V., Ponasenko A.V., Shukevich D.L., Matveeva V.G., Radivilko A.S., Tsepokina A.V., Velikanova E.A., Kornelyuk R.A., Ivkin A.A. Mitochondrial DNA as a candidate DAMP in critical conditions. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine, 2019, vol. 18, no. 3, pp. 134–143. (In Russ.)*] *doi: 10.20538/1682-0363-2019-3-134-143*
3. Пинегин Б.В., Воробьева Н.В., Пащенков М.В., Черняк Б.В. Роль митохондриальных активных форм кислорода в активации врожденного иммунитета // Иммунология. 2018. Т. 39, № 4. С. 221–229. [Pinegin B.V., Vorob'eva N.V., Pashchenkov M.V., Chernyak B.V. The role of mitochondrial reactive oxygen species in the activation of innate immunity. *Immunologiya = Immunologiya, 2018, vol. 39, no. 4. pp. 221–229. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/0206-4952-2018-39-4-221-229*
4. Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю. Биохимическая гетерогенность Т-лимфоцитов // Вестник ВГМУ. 2018. Т. 17, № 6. С. 7–17. [Sheibak V.M., Pavlyukovets A.Yu. Biochemical heterogeneity of T-lymphocytes. *Vestnik Vitebskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta = Vitebsk Medical Jornal, 2018, vol. 17, no. 6. pp. 7–17. (In Russ.)*] *doi: 10.22263/2312-4156.2018.5.7*
5. Abdel El-Gaphar O.A.M., Abo-Youssef A.M., Abo-Saif A.A. Effect of losartan in complete freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Iran J. Pharm. Res., 2018, vol. 17, no. 4, pp. 1420–1430.*
6. Rashida Gnanaprakasam J.N., Wu R., Wang R. Metabolic reprogramming in modulating t cell reactive oxygen species generation and antioxidant capacity. *Front. Immunol., 2018, vol. 16, no. 9: 1075. doi: 10.3389/fimmu.2018.01075*
7. Shekhova E. Mitochondrial reactive oxygen species as major effectors of antimicrobial immunity. *PLoS Pathog., 2020, vol. 16, no. 5: 1008470. doi: 10.1371/journal.ppat.1008470*

8. Tavassolifar M.J., Vodjgani M., Salehi Z., Izad M. The influence of reactive oxygen species in the immune system and pathogenesis of multiple sclerosis. *Autoimmune Dis., 2020, vol. 2020: 5793817. doi: 10.1155/2020/5793817*
9. Varhaug K.N., Kråkenes T., Alme M.N., Vedeler C.A., Bindoff L.A. Mitochondrial complex IV is lost in neurons in the cuprizone mouse model. *Mitochondrion, 2020, vol. 50, pp. 58–62. doi: 10.1016/j.mito.2019.09.003*
10. Zischka H., Einer C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2018, vol. 102, pp. 71–75. doi: 10.1016/j.biocel.2018.07.001*

Авторы:
Скупневский С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Пухаева Е.Г., младший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Бадтиев А.К., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Руруа Ф.К., младший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Батагова Ф.Э., младший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур, аспирант отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия;
Фарниева Ж.Г., младший научный сотрудник лаборатории субклеточных структур, аспирант отдела молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных заболеваний Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, г. Владикавказ, Россия.

Authors:
Skupnevskiy S.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of the RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Pukhaeva E.G., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Badtiev A.K., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Rurua F.K., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Batagova F.E., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Postgraduate of the Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation;
Farnieva Zh.G., Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Postgraduate of the Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.09.2022
Отправлена на доработку 08.11.2022
Принята к печати 21.11.2022

Received 23.09.2022
Revision received 08.11.2022
Accepted 21.11.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 167–170

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 167–170

MICROBIOLOGICAL MONITORING OF NASAL LAVAGE FLUID AS A METHOD FOR EARLY DETECTION AND PREVENTION OF BACTERIAL LUNG COMPLICATIONS IN A PATIENT WITH CYSTIC FIBROSIS

O.V. Kondratenko, A.V. Lyamin, A.A. Ereshchenko, V.A. Antipov

Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. The severity of complications in cystic fibrosis are determined by microorganisms colonizing the lower airways. Paranasal sinuses can be a reservoir of aggressive pathogens. We have developed a method for collection and primary inoculation of nasal lavage fluid from cystic fibrosis patients for microbiological investigation. As a clinical case illustrating the feasibility of this technique, we describe the dynamics of the microflora composition in a patient with cystic fibrosis. The patient had a clinical and microbiological picture of *P. aeruginosa* eradication from the lung tissue, owing to which the antibacterial therapy was stopped. Six months later, the microflora in the nasal lavage fluid and sputum were assessed in parallel. The growth of *P. aeruginosa* (10^2 CFU/mL) but not *P. aeruginosa* in sputum was detected. To determine origin of this strain, the degree of genetic relationship between 5 strains obtained from the patient from 2008 to 2016 was assessed based on bacterial protein profiling. A typical strain of *P. aeruginosa* ATTS 27853 was used as a control. Strains isolated from the patient in 2009 and 2016 were identical suggesting that the antibacterial therapy led to eradication of *P. aeruginosa* in the lungs, but not in the upper airways. Four months later, the growth of *P. aeruginosa* was found in sputum. The patient was prescribed to use antibacterial drugs inhaled into paranasal sinuses. Repeated test performed 3 months later resulted in growth of *P. aeruginosa* 10^1 CFU/mL from nasal lavage fluid, but not from sputum. The patient was referred to a risk group on airway colonization by pathogen strains derived from the upper airway tract. The clinical example illustrates relevance of conducting a regular microbiological study of nasal lavage fluid in order to early identify clinically significant pathogens to prevent their spread to the lower airway tract.

Key words: *cystic fibrosis, nasal lavage, lower airways, paranasal sinuses, sputum, MALDI-ToF mass spectrometry.*

ОПЫТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЖИДКОСТИ НАЗАЛЬНОГО ЛАВАЖА ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТА С МУКОВИСЦИДОЗОМ

Кондратенко О.В., Лямин А.В., Ерещенко А.А., Антипов В.А.

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Тяжесть осложнений при муковисцидозе определятся микроорганизмами, колонизирующими нижние дыхательные пути. Однако параназальные синусы также способны быть резервуаром агрессивных

Адрес для переписки:
Кондратенко Ольга Владимировна
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (846) 374-10-04, доб. 4574.
E-mail: o.v.kondratenko@samsmu.ru

Contacts:
Olga V. Kondratenko
443079, Russian Federation, Samara, Gagarin str., 18,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (846) 374-10-04, add. 4574.
E-mail: o.v.kondratenko@samsmu.ru

Для цитирования:
Кондратенко О.В., Лямин А.В., Ерещенко А.А., Антипов В.А. Опыт микробиологического мониторинга жидкости назального лаважа для раннего выявления и профилактики бактериальных осложнений легких у пациента с муковисцидозом // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 167–170. doi: 10.15789/2220-7619-MMO-2055

Citation:
Kondratenko O.V., Lyamin A.V., Ereshchenko A.A., Antipov V.A. Microbiological monitoring of nasal lavage fluid as a method for early detection and prevention of bacterial lung complications in a patient with cystic fibrosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 167–170. doi: 10.15789/2220-7619-MMO-2055

© Kondratenko O.V. et al., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MMO-2055

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

патогенов. Нами был разработан способ сбора и первичного посева жидкости назального лаважа от пациентов с муковисцидозом для микробиологического исследования. В качестве клинического примера, иллюстрирующего возможности применения данной методики, приводится описание динамики микрофлоры пациента с муковисцидозом. У пациента отмечалась клиническая и микробиологическая картина эрадикации *P. aeruginosa* из легочной ткани, в связи с чем было остановлено проведение антибактериальной терапии. Спустя 6 месяцев было проведено исследование микрофлоры жидкости назального лаважа пациента с параллельным посевом мокроты. Получен рост культуры *P. aeruginosa* 10^2 КОЕ/мл, в мокроте роста культуры *P. aeruginosa* получено не было. Для решения вопроса о происхождении данного штамма была проведена оценка степени генетического родства между 5 штаммами, полученными от пациента в период с 2008 по 2016 гг. на основании их белкового профилирования. В качестве контрольного штамма был использован типовой штамм *P. aeruginosa* ATTC 27853. Установлено, что штаммы, выделенные от пациента в 2009 и 2016 гг., являются идентичными. Это обстоятельство свидетельствует о том, что проведенная антибактериальная терапия привела к эрадикации возбудителя в ткани легких, но при этом не воздействовала на него в верхних дыхательных путях. Спустя 3 месяца вновь был получен рост культуры *P. aeruginosa* в мокроте. Пациенту назначена антибактериальная терапия, включающая введение ингаляционных антибактериальных препаратов в параназальные синусы. При повторном исследовании жидкости назального лаважа с параллельным посевом мокроты пациента спустя 3 месяца получен рост культуры *P. aeruginosa* 10^1 КОЕ/мл из жидкости назального лаважа, то есть отмечена тенденция к снижению титра возбудителя в верхних дыхательных путях. В мокроте роста культуры *P. aeruginosa* получено не было. Пациент отнесен к группе риска по колонизации нижних дыхательных путей штаммами из верхних дыхательных путей. Клинический пример иллюстрирует необходимость и актуальность проведения регулярного микробиологического исследования жидкости назального лаважа с целью раннего выявления клинически значимых возбудителей и проведения профилактических мероприятий по недопущению их распространения в нижние дыхательные пути.

Ключевые слова: *муковисцидоз, назальный лаваж, нижние дыхательные пути, параназальные синусы, мокрота, MALDI-Tof масс-спектрометрия.*

Introduction

Cystic fibrosis is the most common genetic pathology. The prognosis of the disease, in most cases, will be determined by bacterial pathogens colonizing the lower airways (LA) [1, 2, 3]. The works of foreign authors show that paranasal sinuses are able to be a reservoir for infection and a zone for adapting aggressive clones. Such pathogens are *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia* complex, MRSA and others, which become sources of infection with LA [5, 6]. A unified algorithm for the study of nasal sinus microflora in patients with cystic fibrosis has not been developed in the Russian Federation at the moment. We have developed a method for collecting and primary inoculation of nasal lavage fluid from cystic fibrosis patients for microbiological examination (Patent for Invention No. 2659155) [4].

As a clinical example illustrating the possibility of using this method in the practical work of doctors of centers for the treatment of cystic fibrosis, we describe the dynamics of the microflora of patient R. Patient is 16 years old and is being monitored at the center for the treatment of cystic fibrosis with a diagnosis: Cystic fibrosis, mixed form, severe course. delF508/N1303K mutations. The diagnosis was made at the age of two, in 2004. From 2004 to 2014, the sputum showed an increase in *P. aeruginosa*. During antibacterial therapy from 2014 to 2016, a clinical and microbiological picture of eradication of the pathogen from pulmonary tissue was noted (in accordance with the requirements of the European Consensus: Early therapy and prevention of lung damage in cystic fibrosis (2004) — presence of at least three times negative crops within six months)) [7]. Considering the clinical improvement and the results of the microbiological study in 2016, antibacterial therapy for *P. aeruginosa* was discontinued. In November 2016, a parallel research of the microflora of nasal lavage fluid and sputum was conducted. The study resulted in growth of *P. aeruginosa* 10^2 CFU/mL culture in nasal lavage fluid with no growth of *P. aeruginosa* culture in sputum.

For the period from 2008 to 2016, we preserved 5 strains of *P. aeruginosa* isolated from this patient, including a strain obtained from nasal lavage fluid. Considering the previous clinical and microbiological picture of eradication from LA, it was unclear whether this was colonization of paranasal sinuses with a new strain of *P. aeruginosa*, or whether the strain was eroded from LA, but was able to persist in the sinuses. In order to understand these epidemiological aspects, we assessed the degree of genetic relationship between strains obtained from the patient at different times based on their protein profiling. For this purpose, protein spectrums of strains were obtained

using the formic acid extraction method. The results were then cluster analyzed using the MALDI-ToF mass spectrometry method.

The strains obtained from the patient were numbered from 1 to 5, while strain 1 was obtained in July 2008 (sputum), strain 2 — in March 2009 (sputum), strain 3 — in May 2009 (sputum), strain 4 — in December 2008 (sputum), strain 5 — in November 2016 (nasal lavage liquid). Typical strain *P. aeruginosa* ATTS 27853 (strain 6) was used as a control strain for dendrogram construction. The obtained data were visualized using a cluster dendrogram (Fig., see color plate, p. I).

The dendrogram shows that strains from 1 to 5 have signs of genetic relationship. At the same time strain 6 is significantly distanced from them. Strains 1 and 3 as well as 4 and 5 are found to be descendants of the same clone. Strains 1 and 3, as well as 4 and 5 have a minimum distance level, which allows them to be considered genetically identical. The presented dendrogram clearly demonstrates that the strains isolated from the patient in 2009 and 2016 are identical. This circumstance indicates that the conducted antibacterial therapy led to the eradication of the pathogen in the lung tissue, but did not affect it in the upper airways (UA). In March 2017, the patient's sputum was retested. The recommended sinus debridement was not carried out due to the low compliance of the patient, taking into account his age characteristics. In sputum, growth of the *P. aeruginosa* culture was obtained again. Analyzing the results of the microbiological research, the patient was re-prescribed antibacterial therapy for this pathogen. It included not only nebulizer therapy with LA, but also the introduction of inhaled antibacterial drugs into paranasal sinuses. In June 2018, a retest of the nasal lavage fluid with parallel culture of the patient's sputum was performed. As a result of testing of the nasal lavage fluid, growth of the culture of *P. aeruginosa* 10^1 CFU/ml was obtained. Thus, there was a tendency towards a decrease in the titer of the pathogen in UA. No growth of *P. aeruginosa* culture was obtained in sputum after antibacterial therapy. However, the persistence of the strain in UA suggests the possibility of its appearance in sputum in the coming months, if the corresponding therapy with UA is not continued. This patient is considered by us as being at risk for airway colonization of strains from UA.

This clinical example clearly illustrates the necessity and relevance of conducting a regular microbiological study of nasal lavage fluid in order to early identify clinically significant pathogens and carry out preventive measures to prevent their spread in the LA.

Acknowledgements

The authors express gratitude to the head of the Samara Center for the Treatment of Cystic Fibrosis Elena A. Vasilyeva for help in organizing the study.

References

1. Козлов А.В. Хроническая инфекция дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом: обмен железа и его значение // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2019. № 4. С. 62–67. [Kozlov A.V. Chronic respiratory tract infection in patients with cystic fibrosis: metabolism of iron and its significance. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology, 2019, no. 4, pp. 62–67. (In Russ.)*] *doi: 10.14427/jipai.2019.4.62*
2. Козлов А.В., Гусякова О.А., Ерещенко А.А., Халиулин А.В. Диагностические возможности современного биохимического исследования мокроты у пациентов с муковисцидозом (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64, № 1. С. 24–28. [Kozlov A.V., Gusyakova O.A., Ereshchenko A.A., Khaliulin A.V. Diagnostic possibilities of modern biochemical study of sputum from patients with cystic fibrosis (literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 24–28. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-1-24-28*
3. Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Халиулин А.В. Обмен железа в бактериальной клетке: от физиологического значения к новому классу антимикробных препаратов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022. Т. 24, № 2. С. 165–170. [Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusyakova O.A., Khaliulin A.V. Iron metabolism in bacterial cells: from physiological significance to a new class of antimicrobial agents. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2022, vol. 24, no. 2, pp. 165–170. (In Russ.)*] *doi: 10.36488/cmac.2022.2.165-170*
4. Патент № 2659155 Российская Федерация, МПК G01N 33/487(2006.01). Способ сбора и первичного посева жидкости назального лаважа от пациентов с муковисцидозом для микробиологического исследования: № 2017122649; заявлено 2017.06.27: опубликовано 2018.06.28 / Кондратенко О.В., Лямин А.В., Медведева А.В., Ермолаева А.Д. Патентообладатель: Кондратенко Ольга Владимировна. 6 с. [Patent No. 2659155 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/487(2006.01). Method of collection and primary sowing of nasal lavage fluid from patients with cystic fibrosis for microbiological examination. No. 2017122649; application: 2017.06.27: date of publication 2018.06.28 / Kondratenko O.V., Lyamin A.V., Medvedeva E.D., Ermolaeva A.V. Proprietor: Kondratenko Olga Vladimirovna. 6 p.]
5. Berkhout M.C., Rijntjes E., El Bouazzaoui L.H., Fokkens W.J., Brimicombe R.W., Heijerman H.G. Importance of bacteriology in upper airways of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros., 2013, vol. 12, no. 5, pp. 525–529. doi: 10.1016/j.jcf.2013.01.002*

6. Choi K.J., Cheng T.Z., Honeybrook A.L., Gray A.L., Snyder L.D., Palmer S.M., Abi Hachem R., Jang D.W. Correlation between sinus and lung cultures in lung transplant patients with cystic fibrosis. *Int. Forum Allergy Rhinol., 2018, vol. 8, no. 3, pp. 389–393. doi: 10.1002/alr.22067*
7. Döring G., Hoiby N. Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J. Cyst. Fibros., 2004, vol. 3, no. 2, pp. 67–91. doi: 10.1016/j.jcf.2004.03.008*

Авторы:
Кондратенко О.В., д.м.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Лямин А.В., д.м.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Ерещенко А.А., ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Антипов В.А., ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:
Kondratenko O.V., DSc (Medicine), Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Lyamin A.V., DSc (Medicine), Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Ereshchenko A.A., Assistant Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Antipov V.A., Assistant Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.10.2022
Отправлена на доработку 08.11.2022
Принята к печати 21.11.2022

Received 26.10.2022
Revision received 08.11.2022
Accepted 21.11.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 171–173

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 171–173

RAS AND SARS-CoV-2 INTERACTION: SHORT REVIEW OF THE LATEST EVIDENCE

A. Vitiello[a], F. Ferrara[b]

[a] *Ministry of Health, Rome, Italy*
[b] *Asl Napoli 3 Sud, Naples, Italy*

Abstract. Coronavirus SARS-CoV-2 is responsible for the coronavirus disease (COVID-19) cause of the recent global pandemic, which is causing thousands of deaths worldwide and represents a health challenge with few precedents in human history. The angiotensin 2 conversion enzyme (ACE-2) has been identified as the receptor that facilitates access to SARS-CoV-2 in cells; evidence shows that its concentration varies during the various stages of viral infection. Therapeutic agents modifying the renin-angiotensin system (RAS) may be able to modulate the concentration of ACE-2 and the various components of the system. In this article we examine the latest evidence on the association between the use of RAS modifying agents and coronavirus 2019 (COVID-19) disease caused by SARS-CoV-2. Our investigation and critical literature research does not suggest discontinuation of ACEIs/ARBs treatment in clinical practice as there is a lack of robust evidence. However, we recommend further well-structured epidemiological studies investigating this sensitive issue that may provide important new suggestions for implementing guidelines.

Key words: *COVID-19, renin-angiotensin system, SARS-CoV-2, pandemic.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ SARS-CoV-2 И РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ: КРАТКИЙ ОБЗОР ПОСЛЕДНИХ ДАННЫХ

Витиэлло А.[1], Фэррара Ф.[2]

[1] *Министерство здравоохранения, Рим, Италия*
[2] *Местный отдел здравоохранения юга Неаполя, г. Неаполь, Италия*

Резюме. Коронавирус SARS-CoV-2 является причиной коронавирусной болезни (COVID-19), вызвавшей недавнюю глобальную пандемию, которая унесла тысячи жизней во всем мире и представляет собой проблему для здоровья, имеющую лишь несколько прецедентов в истории человечества. Ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE-2) был идентифицирован как рецептор, который облегчает доступ к SARS-CoV-2 в клетку; данные показывают, что его концентрация варьируется на разных стадиях вирусной инфекции. Терапевтические агенты, модифицирующие ренин-ангиотензиновую систему (РАС), могут быть способны модулировать концентрацию ACE-2 и различных компонентов системы. В этой статье мы исследуем последние доказательства связи между использованием агентов, модифицирующих RAS, и COVID-19. Наше исследование и данные литературы не предлагают прекращения лечения ACEIs/ARBs в клинической практике, поскольку для этого отсутствуют надежные доказательства. Тем не менее мы рекомендуем провести дальнейшие хорошо структурированные эпидемиологические исследования этой деликатной темы, результаты которых могут способствовать появлению новые принципов терапии COVID-19.

Ключевые слова: *COVID-19, ренин-ангиотензиновая система, SARS-CoV-2, пандемия.*

Адрес для переписки:
Франческо Феррара
80035, Италия, Неаполь, комунна Нола, ул. Делл'амичизия, 22.
E-mail: ferrarafr@libero.it; f.ferrara@aslnapoli3sud.it

Contacts:
Francesco Ferrara
Asl Napoli 3 Sud, Dell'amicizia str., 22, 80035, Nola, Naples, Italy.
E-mail: ferrarafr@libero.it; f.ferrara@aslnapoli3sud.it

Для цитирования:
Витиэлло А., Фэррара Ф. Взаимодействие SARS-CoV-2 и ренин-ангиотензиновой системы: краткий обзор последних данных // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 171–173. doi: 10.15789/2220-7619-TCB-1613

Citation:
Vitiello A., Ferrara F. RAS and SARS-CoV-2 interaction: short review of the latest evidence // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 171–173. doi: 10.15789/2220-7619-TCB-1613

© Vitiello A., Ferrara F., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TCB-1613

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

The SARS-CoV-2 (COVID-19) virus is responsible for the current global pandemic, causing thousands of deaths and responsible for a health challenge with few precedents for humanity. SARS-CoV-2 is a family of RNA viruses capable of infecting humans and causing respiratory distress syndrome with severe lung injury in some fatal cases [2]. Studies have shown that SARS-CoV-2 has about 80% of the SARS-CoV-like genome responsible for the 2003 outbreak [4, 6]. Evidence shows that viral infection has several stages: in the first stages an asymptomatic or slightly symptomatic clinical course is described, the subsequent moderately severe stages characterised by a pulmonary inflammatory state, the last very severe stages characterised by a generalised inflammatory state affecting all tissues causing multi-organ dysfunction and in some cases death [1]. Biochemical interaction studies have shown that SARS-CoV-2 virus enters host cells mainly through the use of the spike protein (S) [10, 11] through the angiotensin 2 conversion enzyme receptor (ACE-2) on the cell surface [10]. ACE-2 is also a conversion enzyme that is part of the renin-angiotensin system (RAS). Is there a scientific debate going on since the beginning of the pandemic, is an increase of ACE-2 responsible for a higher probability of COVID-19 infection? Lung tissues are probably an easier entry route for SARS-CoV-2 because 83% of ACE-2 receptors are present in type II pneumocytes that produce surfactants that prevent to the alveoli to collapse [12]. The RAS modulating drugs are widely used in the treatment of cardiovascular diseases, but what is the correlation between these drugs, RAS and COVID-19? Can they play a protective role by modulating the expression of RAS components? Or, on the contrary, are these drugs considered risk factors for COVID-19?

To date, it is strongly recommended not to interrupt the treatment with the usual therapy of RAS modulating drugs, because no clinical or scientific evidence suggests this [3]. Agents acting on RAS can be distinguished as inhibitors of the angiotensin conversion enzyme (ACEI), Angiotensin II receptor blockers (ARB) and direct renin inhibitors (DRI) (Bavishi et al., 2020). These agents are currently indicated for the treatment of various cardiovascular diseases with excellent clinical efficacy. ACEIs are able to reduce blood pressure by acting with ACE inhibition which converts Ang I to Ang II. ARBs are Ang II antagonists on the type 1 receptor (AT-1r), finally, DRIs block plasma renin activity and inhibit the conversion of angiotensinogen to Ang I. The three different classes described above have different effects on the regulation and enzymatic expression of RAS [9]. A retrospective epidemio-

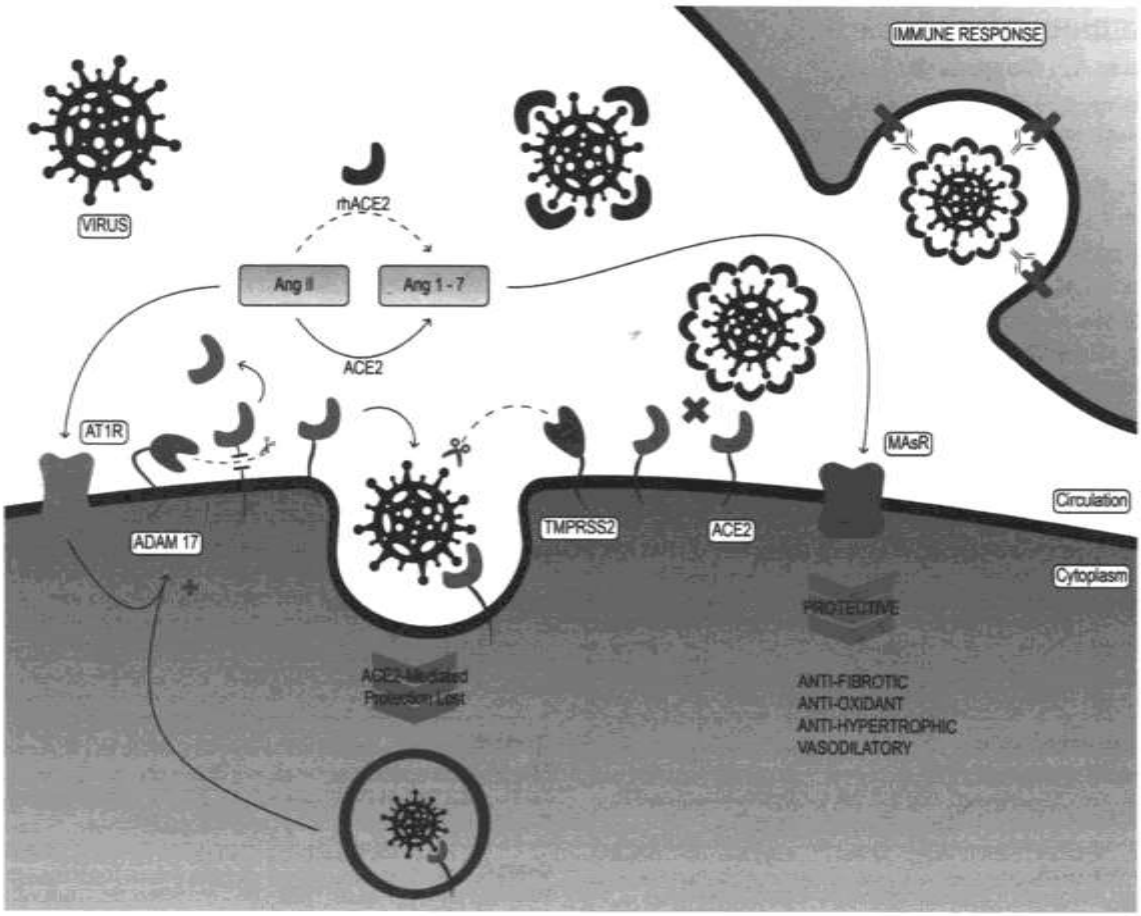


Figure. SARS-CoV-2 and ACE-2 interaction

Comments. SARS-CoV-2 penetrates cells by binding the peak viral protein (S) to ACE-2. ACE-2 converts Ang II to Ang 1–7. Ang 1–7 has opposite biological actions to Ang II, antifibrotic, antioxidant and antihypertrophic effects through the stimulation of MasR.

logical cohort study using database data showed that the use of ACEI or ARB was not significantly associated with mortality and diagnosis of COVID-19, respectively [5]. Another study using electronic health records from the University of New York (NYU) Langone Health showed no significant correlation and association between the use of ACEI/ARB and the development of COVID-19 and COVID-19 severe, respectively [7]. In addition, another retrospective and multicentre study conducted on a large scale in adult hypertensive patients with COVID-19 in Hubei, China 9, showed that the use of ACEI or ARB was significantly associated with a lower probability of mortality due to different causes than non-users of ACEI/ARB, probably for a greater and more effective management of underlying cardiovascular disease in the patients considered. Finally, some studies have not been considered because they show inconsistent data [13]. In addition, in several studies, investigations in patients receiving ACEi or ARB treatment did not have higher plasma concentrations and significant changes in ACE-2, in contrast to in vitro data [8]. In conclusion, based on currently available data and taking into account evidence of reduced mortality in cardiovascular disease, ACE-I and ARB therapy should be maintained or initiated in patients with cardiovascular disease according to current guidelines of the major scientific societies.

References

1. Ashour H.M., Elkhatib W.F., Rahman M.M., Elshabrawy H.A. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. *Pathogens, 2020, vol. 9, no. 3: 186. doi: 10.3390/pathogens9030186*
2. Baig A.M., Khaleeq A., Ali U., Syeda H. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host-virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem. Neurosci., 2020, vol. 11, no. 7, pp. 995–998. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00122*
3. Bavishi C., Bangalore S., Messerli F.H. Renin angiotensin aldosterone system inhibitors in hypertension: is there evidence for benefit independent of blood pressure reduction? *Prog. Cardiovasc. Dis., 2016, vol. 59, no. 3, pp. 253–261. doi: 10.1016/j.pcad.2016.10.002*
4. Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C., Di Napoli R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.*
5. Fosbøl E.L., Butt J.H., Østergaard L., Andersson C., Selmer C., Kragholm K., Schou M., Phelps M., Gislason G.H., Gerds T.A., Torp-Pedersen C., Køber L. Association of angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker use with COVID-19 diagnosis and mortality. *JAMA, 2020, vol. 324, no. 2, pp. 168–177. doi: 10.1001/jama.2020.11301*
6. Liu Z., Xiao X., Wei X., Li J., Yang J., Tan H., Zhu J., Zhang Q., Wu J., Liu L. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol., 2020, vol. 92, no. 6, pp. 595–601. doi: 10.1002/jmv.25726*
7. Reynolds H.R., Adhikari S., Pulgarin C., Troxel A.B., Iturrate E., Johnson S.B., Hausvater A., Newman J.D., Berger J.S., Bangalore S., Katz S.D., Fishman G.I., Kunichoff D., Chen Y., Ogedegbe G., Hochman J.S. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors and risk of COVID-19. *N. Engl. J. Med., 2020, vol. 382, no. 25, pp. 2441–2448. doi: 10.1056/NEJMoa2008975*
8. Sama I.E., Ravera A., Santema B.T., van Goor H., Ter Maaten J.M., Cleland J.G.F., Rienstra M., Friedrich A.W., Samani N.J., Ng L.L., Dickstein K., Lang C.C., Filippatos G., Anker S.D., Ponikowski P., Metra M., van Veldhuisen D.J., Voors A.A. Circulating plasma concentrations of angiotensin-converting enzyme 2 in men and women with heart failure and effects of renin-angiotensin-aldosterone inhibitors. *Eur. Heart J., 2020, vol. 41, no. 19, pp. 1810–1817. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa373*
9. Vitiello A., Ferrara F. Correlation between renin-angiotensin system and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 infection: what do we know? *Eur. J. Pharmacol., 2020, vol. 883: 173373. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173373*
10. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell, 2020, vol. 183, no. 6: 1735. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.032.*
11. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science, 2020, vol. 367, no. 6485, pp. 1444–1448. doi: 10.1126/science.abb2762*
12. Zhang H., Penninger J.M., Li Y., Zhong N., Slutsky A.S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med., 2020, vol. 46, no. 4, pp. 586–590. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9*
13. Zhang P., Zhu L., Cai J., Lei F., Qin J.J., Xie J., Liu Y.M., Zhao Y.C., Huang X., Lin L., Xia M., Chen M.M., Cheng X., Zhang X., Guo D., Peng Y., Ji Y.X., Chen J., She Z.G., Wang Y., Xu Q., Tan R., Wang H., Lin J., Luo P., Fu S., Cai H., Ye P., Xiao B., Mao W., Liu L., Yan Y., Liu M., Chen M., Zhang X.J., Wang X., Touyz R.M., Xia J., Zhang B.H., Huang X., Yuan Y., Loomba R., Liu P.P., Li H. Association of inpatient use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin ii receptor blockers with mortality among patients with hypertension hospitalized with COVID-19. *Circ. Res., 2020, vol. 126, no. 12, pp. 1671–1681. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317134*

Авторы:

Витиэлло А., клинический фармаколог, Министерство здравоохранения, Рим, Италия;
Фэррара Ф., госпитальный фармацевт фармацевтического отдела Местного отдела здравоохранения юга Неаполя, г. Неаполь, Италия.

Authors:

Vitiello A., Clinical Pharmacologist, Ministry of Health, Rome, Italy;
Ferrara F., Hospital Pharmacist Manager, Pharmaceutical Department, Asl Napoli 3 Sud, Naples, Italy.

Поступила в редакцию 15.10.2020
Принята к печати 29.11.2020

Received 15.10.2020
Accepted 29.11.2020

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 174–182

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 174–182

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 У РЕБЕНКА НА ФОНЕ МОРБИДНОГО ОЖИРЕНИЯ

К.В. Самойлов[1], Ю.А. Ермолаева[1], Д.А. Пономарева[1], А.А. Худякова[1], А.В. Проценко[2]

[1] ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия
[2] ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Пандемия коронавирусной инфекции характеризуется низким процентом осложнений и тяжелых форм у детей по сравнению со взрослым населением. Однако в литературе описаны случаи тяжелого течения COVID-19 у детей с коморбидными состояниями. К таким фоновым заболеваниям относится ожирение. Целью настоящего исследования стал анализ тяжелого течения новой коронавирусной инфекции на фоне морбидного ожирения у пациентки педиатрического профиля. *Материалы и методы.* Изучена вся сопроводительная медицинская документация пациентки. *Результаты и обсуждение.* Из анамнеза жизни известно, что больную длительное время беспокоил интенсивный прирост массы тела, по поводу которого неоднократно проходила обследования. В 2018 г. впервые диагностирован гипоталамический синдром пубертатного периода, по поводу которого пациентка принимала на постоянной основе гипогликемические и гипотензивные препараты, гепатопротекторы. В эпидемиологическом анамнезе установлен факт внутрисемейного контакта по COVID-19 с матерью. Основное заболевание началось остро, с подъема температуры тела до 39–39,5°С, кашля и слабости. На протяжении I недели болезни пациентка не обращалась за медицинской помощью и лечилась самостоятельно без должного эффекта. При измерении сатурации был отмечен низкий уровень кислорода (SpO_2 71%). В связи с этим больной была выполнена компьютерная томография органов грудной клетки и выявлено двустороннее интерстициальное полисегментарное поражение легких с признаками консолидации. После экстренной госпитализации больной была назначена эмпирическая антибактериальная терапия, противоспалительное и антитромботическое лечение, а также оказана респираторная поддержка. В стационаре был получен положительный результат ПЦР мазка из зева и носа на SARS-CoV-2. В связи с плохим ответом на терапию больная была переведена в респираторный госпиталь. На момент поступления состояние было расценено как тяжелое за счет выраженной дыхательной недостаточности и наличия преморбидного фона. Комплекс лечебных мероприятий включал оксигенотерапию, антибактериальную и антикоагуляционную терапию, а также препараты сурфактанта и аналог нуклеозидов Ремдесивир. На фоне лечения отмечена положительная динамика, и через 6 дней госпитализации пациентка более не нуждалась в респираторной поддержке. По результатам повторной компьютерной томографии диагностирована двусторонняя интерстициальная полисегментарная пневмония с поражением легочной ткани до 95%. В последующие дни госпитализации состояние пациентки оставалось стабильным, признаки дыхательной недостаточности отсутствовали. На 20 день болезни больная была выписана из стационара с пол-

Адрес для переписки:
Самойлов Кирилл Владимирович
634050, Россия, Томск, Московский тракт, 2,
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (923) 437-12-72
E-mail: samoilov.krl@gmail.com

Contacts:
Kirill V. Samoylov
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky trakt, 2,
Siberian State Medical University.
Phone: +7 (923) 437-12-72.
E-mail: samoilov.krl@gmail.com

Для цитирования:
Самойлов К.В., Ермолаева Ю.А., Пономарева Д.А., Худякова А.А., Проценко А.В. Клинический случай тяжелого течения COVID-19 у ребенка на фоне морбидного ожирения // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 174–182. doi: 10.15789/2220-7619-CCO-2109

Citation:
Samoylov K.V., Ermolaeva Yu.A., Ponomareva D.A., Khudyakova A.A., Protsenko A.V. Clinical case of severe COVID-19 in a child with morbid obesity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 174–182. doi: 10.15789/2220-7619-CCO-2109

© Самойлов К.В. и соавт., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CCO-2109

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

ным клиническим выздоровлением. *Заключение.* Данный клинический случай демонстрирует роль преморбидного фона в утяжелении клинической картины новой коронавирусной инфекции у ребенка. Тщательное изучение особенностей анамнеза является необходимым у пациентов любого возраста, даже с неосложненным течением болезни.

Ключевые слова: *COVID-19, новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, пневмония, морбидное ожирение, гипоталамический синдром, дети.*

CLINICAL CASE OF SEVERE COVID-19 IN A CHILD WITH MORBID OBESITY

Samoylov K.V.[a], Ermolaeva Yu.A.[a], Ponomareva D.A.[a], Khudyakova A.A.[a], Protsenko A.V.[b]

[a] *Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation*
[b] *Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. The pandemic of coronavirus infection is characterized by a low percentage of complications and severe forms in sick children compared to the adult population. However, there have been described cases of severe clinical course of COVID-19 in children with comorbidities among which is obesity. The aim of this study was to analyze the severe course of a new coronavirus infection paralleled with morbid obesity in a pediatric patient. *Materials and methods.* All accompanying patient medical documentation was examined. *Results and discussion.* From the anamnesis of life it is known that the patient was long time complained of intensively increased body weight, on which she repeatedly underwent examinations. In 2018, hypothalamic pubertal syndrome was diagnosed for the first time, for which the patient received hypoglycemic and antihypertensive drugs, hepatoprotectors on an ongoing basis. In the epidemiological anamnesis, the intrafamilial COVID-19 contact with mother was established. The main disease began acutely with a rise in body temperature up to 39–39.5°C, cough and weakness. During the first week of illness, the patient did not seek medical help and receive self-treatment, but the positive effect was not achieved. Saturation measurement showed low oxygen level (SpO_2 71%). In this regard, the patient underwent chest computed tomography, which revealed a bilateral interstitial polysegmental lung lesion with signs of consolidation. After emergency hospitalization, the patient was prescribed empiric antibiotic therapy, anti-inflammatory and antithrombotic treatment, as well as respiratory support. A positive PCR result of a throat and nasal swab for SARS-CoV-2 was obtained in the hospital. Due to a poor response to therapy, the patient was transferred to a respiratory hospital. At the time of hospitalization, the condition was considered severe due to severe respiratory failure and premorbidity. The range of treatments included oxygenotherapy, antibacterial and anticoagulation therapy, as well as surfactant and the nucleoside analogue Remdesivir. During treatment, the clinical picture gained a positive trend, and after 6 days of hospitalization the patient no longer needed respiratory support. According to the results of repeated computed tomography, bilateral interstitial polysegmental pneumonia was diagnosed with damage to the lung tissue up to 95%. The patient remained stable and showed no signs of respiratory failure during the following days of hospitalization. On the 20th day of ilness, the patient was discharged from hospital with full clinical recovery. *Conclusion.* This clinical case demonstrates the role of premorbid background in aggravating the clinical picture of a new coronavirus infection in a child. Careful study of anamnestic characteristics is necessary in patients of any age, even with an uncomplicated disease course.

Key words: *COVID-19, new coronavirus infection, SARS-CoV-2, pneumonia, morbid obesity, hypothalamic syndrome, children.*

Введение

В декабре 2019 г. на территории китайского города Ухань впервые была зафиксирована вспышка заболевания, обусловленного вирусом SARS-CoV-2, который как и другие патогены из семейства *Coronaviridae* (SARS-CoV-1 и MERS-CoV), склонен вызывать острый респираторный дистресс-синдром [4, 7]. Однако такое течение заболевания остается уделом взрослого населения, в то время как развитие тяжелого варианта отмечается лишь в 1% всех случаев инфекции у детей, а госпитализации подлежат только до 10% заболевших [5]. По данным ВОЗ, смертность от COVID-19 среди детей от 5 до 14 лет составляет 0,1% от всех случаев, и несколько больший процент (0,4%) определен для группы старшего подросткового возраста [1]. Некоторыми авторами показано, что утяжеление клинических проявлений ассоциировано с определенными сопутствующими состояниями, играющими роль фоновой патологии [9]. Одним из таких заболеваний можно считать ожирение. В литературе накопилось достаточно информации о негативном влиянии избытка массы на течение COVID-19 у взрослых больных [2, 3], а по данным некоторых авторов — и у детей [6, 8]. Серьезный преморбидный фон может диктовать необходимость для расширения медикаментозной терапии с применением респираторной поддержки в данной группе больных.

Цель исследования — описать детали клинического случая пациентки с тяжелым течение COVID-19 на фоне морбидного ожирения.

Материалы и методы

Основными источниками информации о состоянии здоровья пациентки послужили данные медицинских карт стационарного больного (форма 003/у) за следующие периоды: с 03.11.2021 по 04.11.2021 (больная находилась в отделение реанимации и интенсивной терапии ОГАУЗ «Детская инфекционная больница им. Г.Е. Сибирцева») и с 04.11.2021 по 15.11.21 (последующее лечение в респираторном госпитале и инфекционном отделении ОГБУЗ «Медико-санитарная часть № 2»).

Дополнительно были изучены выписки из историй болезни за прошлые госпитализации в эндокринологическое отделение ОГАУЗ Детской больницы № 1 (за 2014 и 2018 г.) и соматическое отделение ОГАУЗ Детской городской больницы № 2 (за 2016 год), а также история развития ребенка (форма 112/у).

Результаты и обсуждение

Пациентка Е., 2003 г. рождения (17 лет). Из анамнеза жизни известно, что девушка росла и развивалась по календарному возрасту. Вакцинация проведена согласно Национальному календарю профилактических прививок за исключением иммунизации против гриппа. Пациентка не входила в категорию часто болеющих. В медицинской документации из хирургических вмешательств упоминалось только иссечение невуса шеи в 2020 г. В ходе расспроса удалось установить отягощенность генеалогического анамнеза — у родственников по материнской линии диагностирована гипертоническая болезнь. Среди детских инфекций была перенесена только ветряная оспа. Анализ истории развития ребенка показал отсутствие каких-либо аллергических заболеваний или риска их развития. Данные за туберкулез, гепатит, инфекции, передаваемые половым путем, и онкологические заболевания у пациентки отсутствовали.

Внимание привлек тот факт, что у больной отмечались большие прибавки в весе, начиная с раннего возраста. По поводу избытка массы тела в 2014 г. впервые прошла обследование и лечение в эндокринологическом отделении ОГАУЗ Детской больницы №1. По анамнестическим данным больная продолжала прибавлять в весе после выписки из стационара, в связи с чем и состояла на диспансерном учете у эндокринолога в поликлинике. При последующей госпитализации в ОГАУЗ «Детская городская больница № 2» в 2016 г. в ходе полного обследования был выставлен диагноз «Гипоталамический синдром». Несмотря на проведенный курс терапии, динамика заболевания носила отрицательный характер: за 2017 г. прибавка в весе составила 30 кг, а также появилось большое количество свежих стрий на теле и впервые зафиксировано повышение артериального давления до 150/90 мм рт.ст. Во время последней плановой госпитализации в эндокринологическое отделение ОГАУЗ Детская больница № 1 в 2018 г. был уточнен основной диагноз: «Гипоталамический синдром пубертатного периода средней степени тяжести на фоне морбидного ожирения (вес на момент выписки — 133 кг, ИМТ = 50,1, SDS ИМТ = +5.04). Осложнение: Стеатогепатоз, жировая инфильтрация поджелудочной железы, гиперинсулинизм, артериальная гипертензия». По поводу вышеописанных состояний больной была назначена строгая диета, а также прием следующих препаратов на постоянной основе: Фосфатидилхолин и Натрия глицирризинат (1 капсула, 3 раза в день), Фуросемид (40 мг каждые 3 дня, на 4 день — перерыв), Аспарагинат Магния и Калия (1 таблетка, 3 раза в день), Тиоктовая кислота (0,05 г, 3 раза в день), Метформин (850 мг, 1 раз в день, в вечернее время). Несмотря на данные клинической картины (морбидное ожирение эндокринного генеза) и высокий уровень инсулина (19,9 мкЕд/мл), результаты стандартного теста толерантности к глюкозе у больной были в пределах нормы (глюкоза до нагрузки — 4,6 ммоль/л; через 2 ч — 6,0 ммоль/л).

В эпидемиологическом анамнезе обращал на себя внимание внутрисемейный контакт по коронавирусной инфекции с матерью от 22.10.21. Пациентка училась в колледже, обучение проходило в дистанционном формате с начала 2020 г. За 14 дней до госпитализации (03.11.21) не выезжала за пределы Томской области.

В конце октября 2021 г. на территории Томска продолжал доминировать «сибирский» штамм COVID-19 (B.1.1.397+), что позволяет предположить его в качестве этиологического фактора.

Из анамнеза заболевания известно, что пациентка заболела остро 27.10, когда впервые поднялась температура тела до 39–39,5°С, появились кашель и вялость. За медицинской помощью не обращалась, самостоятельно начала прием Азитромицина (*per os*, по 500 мг 1 раз в день) и Умифеновира (дозировку назвать затрудняется) на фоне сохранявшейся температурной реакции. Начало второго дня болезни (28.10) сопровождалось фебрильной лихорадкой; сохранялись проявления интоксикационного синдрома в виде слабости и сонливости. С 29.10 (3 день болезни) впервые

появилась одышка, больная обратила внимание на снижение аппетита и появление жидкого стул до 4 раз в сутки. Продолжала прием Азитромицина, за медицинской помощью не обращалась. Самостоятельно использовала *per os* Ибупрофен, Парацетамол и Дротаверин со слабым положительным эффектом в виде снижения температуры до 37°С. Жалобы больной со стороны дыхательных путей (одышка и кашель) и желудочно-кишечного тракта сохранялись в прежнем объеме на протяжении последующих 3 дней (с 30.10 по 02.11). Азитромицин и Умифеновир прекратила принимать 2.11 (длительность курса — 7 дней), так как не почувствовала ожидаемого клинического эффекта от препаратов. Динамика жалоб на 7 день болезни (03.11) оставалась неизменной. При измерении сатурации был получен низкий уровень кислорода (71%), в связи с чем больная самостоятельно выполнила спиральную компьютерную томографию органов грудной клетки, где диагностировано: двустороннее интерстициальное полисегментарное поражение легких с признаками консолидации, объем поражения более 76%; признаки легочной гипертензии 1–2 ст. В этот же день вызвала скорую медицинскую помощь и была доставлена в ОГАУЗ Детскую больницу № 1, где осмотрена дежурным врачом и перенаправлена для госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии ОГАУЗ «Детская инфекционная больница им. Г.Е. Сибирцева».

На момент поступления больная предъявляла жалобы на слабость, повышение температуры тела до 39,0°С, одышку, усиливающуюся в положении лежа, жидкий стул до четырех раз за последние сутки.

При поступлении состояние пациентки расценено как тяжелое за счет проявлений катарального синдрома, двухсторонней пневмонии с дыхательной недостаточности II степени и наличия преморбидного фона (ожирение 4 степени).

На момент госпитализации температура тела 37,1°С, что могло быть обусловлено самостоятельным приемом антипиретиков. Больная находилась в сознании, была доступна для контакта. Положение вынужденное — ортопноэ, вызвано тяжелым поражением легких и избытком веса. Со стороны нервной системы отсутствовали очаговые симптомы и менингеальные знаки. Кожные покровы были умеренной влажности, acne vulgaris в большом количестве, обращал на себя внимание периорбитальный и периоральный цианоз, отмечались пигментные изменения по типу acanthosis nigritas в естественных складках кожи. В области груди, живота и плеч большое количество как светлых, так и розовых (лиловых) стрий. Ногтевые ложа с легким цианотичным оттенком, симптом «белого пятна» отрицательный (2 с). Подкожно-жировой слой был развит избыточно с неравномерным распределением по телу: «жировой фартук» на передней брюшной стенке, климактерический горбик в области седьмого шейного позвонка и «галифе» в зоне бедер. Масса тела пациентки по прибытии в стационар составила 150 кг (ИМТ = 55,8 при росте в 164 см). Слизистые оболочки влажные, розовой окраски, без явления энантемы. Язык розовый, суховат, обложен белым налетом. В зеве визуализировались умеренная гиперемия и зернистость задней стенки глотки как проявления катарального синдрома на фоне вирусной инфекции. Периферические лимфоузлы были доступны пальпации, размеры в пределах нормы, их свойства не изменены. Со стороны дыхательной системы наблюдались симптомы, характерные для дыхатель ной недостаточности: экскурсия грудной клетки симметричная, с легким участием вспомогательной мускулатуры; частота дыхательных движений увеличена до 26 в минуту. Однако перкуторный звук сохранял легочный оттенок и свою симметричность над разными отделами легких. Аускультация у пациентки была несколько затруднена — дыхание отчетливо прослушивалось только на верхушках, в остальных отделах выслушивалось плохо; хрипы не определялись. Наиболее вероятно, что жировая ткань, ухудшавшая проведение звука, маскировала настоящую аускультативную картину и не позволяла определить характерные для возможной пневмонии признаки. Показатели сатурации укладывались во II степень дыхательной недостаточности — 81–83%. Со стороны сердечно-сосудистой системы определялась тахикардия до 108 ударов в минуту; ритмичность тонов сердца была сохранена. Несмотря на данные анамнеза жизни, у пациентки на момент поступления оставалось нормальное артериальное давление (АД = 123/74 мм рт.ст.).

После осмотра врачом приемного покоя при поступлении пациентка была переведена в отделение реанимации и интенсивной терапии ОГАУЗ Детская инфекционная больница им. Г.Е. Сибирцева.

Пациентке сразу же был выполнен ряд лабораторных исследований с целью уточнения тяжести ее состояния и определения дальнейшей врачебной тактики.

В общем анализе крови (ОАК) от 04.11 выявлены неспецифические воспалительные изменения (WBC — $5{,}75 \times 10^9$/л, сдвиг лейкоцитарной формулы влево за счет нейтрофилов: палочкоядерные — 11%, сегментоядерные — 62%; LYM — 22%; СОЭ — 50 мм/ч), анемия средней степени тяжести (RBC — $3{,}31 \times 10^{12}$/л, HB — 93 г/л), не-

которое уменьшение количества тромбоцитов (137×10^9/л) и снижение гематокрита (28,7%). Остальные показатели были в пределах нормы.

В биохимическом анализе крови (БАК) от 04.11 определялся повышенный уровень СРБ (24 мг/л) — маркер бактериального воспалительного процесса. Больная сдавала кровь после приема пищи, поэтому зафиксирована постпрандиальная гипергликемия (глюкоза — 6,1 ммоль/л). Прочие показатели были в пределах нормальных значений (креатинин — 82 мкмоль/л, АЛТ — 34 ЕД, АСТ — 36 ЕД).

В анализе свертывающей системы крови от 04.11 выявлена наклонность к гипокоагуляции (АЧТВ — 42 с, ПТИ — 80%, протромбиновое время — 20 с, фибриноген — 2,2 г/л, D-димер — отрицательный).

ПЦР мазка из зева и носа на SARS-CoV-2 (от 04.11) — обнаружена РНК COVID-19.

Принимая во внимание результаты общего и биохимического анализов крови, нельзя было исключить бактериальную инфекцию. Больной была назначена антибактериальная терапия — Цефтриаксон (2,0 г 1 раз в день, внутривенно). Учитывая результаты объективного осмотра и воспалительную реакцию крови, возникла необходимость добавить к терапии Дексаметазон (по 8 мг 2 раза в день, внутривенно) с противовоспалительной целью. Несмотря на то что у пациентки отмечалась гипокоагуляция, требовалось назначение Эноксапарина (40 мг, 2 раза в день, подкожно) согласно методическим рекомендациям по лечению заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией у детей (Версия 2 от 03.07.2020), с целью профилактики тромбозов на период ограниченной двигательной активности в условиях нахождения в ОРИТ. Исходя из жалоб, дополнительно был назначен муколитик Амброксол (по 30 мг 3 раз в день, *per os*).

В отделении реанимации и интенсивной терапии начата неинвазивная вентиляция легких (НВЛ) в гемипрон-позиции — высокопоточная оксигенация (ВПО) flow — 25 л/мин, FiO_2 — 50%. Полная прон-позиция была невозможна для выполнения из-за наличия у пациентки выраженного ожирения, в связи с чем больная находилась в гемипрон-позиции. На фоне респираторной поддержки достигнута SpO_2 92%.

За первый день госпитализации в ОРИТ (04.11, 8 день болезни) на фоне проводимого лечения отмечалась отрицательная динамика состояния пациентки за счет нарастания клинических симптомов дыхательной недостаточности: активного участия вспомогательной мускулатуры в акте дыхания с втяжением межреберных промежутков и яремной ямки, выраженного тахипноэ до 36 в минуту. Однако уровень оксигенации оставался стабильным: на НВЛ — SpO_2 92%, а при дыхании атмосферным воздухом SpO_2 снижалась до 80%.

В связи с низкой эффективностью ранее проводимой респираторной поддержки больная была переведена на масочную вентиляцию в режиме SPONT PC Pi 10 см, ПДКВ — 5 см, ДО — 0,45, МВЛ — 12 л/мин, flow — 25 л/мин, FiO_2 — 50%. На этом фоне была достигнута сатурация 97%. Однако, несмотря на высокопоточную оксигенотерапию (при потоке 45 л/мин и фракции O_2 50%), во время приема пищи происходило снижение сатурации до 92%. В соответствии с вышеописанной картиной и положительным результатом мазка из зева и носа на наличие SARS-CoV-2 пациентка была переведена для дальнейшего лечения в респираторный госпиталь ОГБУЗ «Медико-санитарная часть № 2» с диагнозом «Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (ПЦР мазка от 04.11.21 г. положительная) тяжелой степени, негладкое течение». Осложнение: «Двусторонняя интерстициальная полисегментарная пневмония (объем поражения более 76%). ДН II степени. Легочная гипертензия 1–2 ст.». Сопутствующие диагнозы: «Ожирение (морбидное) 4 степени (ИМТ = 58,7). Анемия средней степени, неуточненной этиологии».

При поступлении в ОГБУЗ «Медико-санитарная часть № 2» девочка была осмотрена врачом-анестезиологом и педиатром. На фоне проводимого лечения в объективном статусе прослеживалась отрицательная динамика за счет нарастания симптомов дыхательной недостаточности: в положении лежа аускультативно определялось жесткое дыхание, крепитация в нижних отделах, больше справа; ослабление дыхания в нижних отдела легких; приглушение тонов сердца.

В соответствии с имеющейся клинической картиной больной была назначена следующая терапия: Парацетамол в качестве антипиретика (500 мг при повышении температуры тела выше 38°С, *per os*), Дексаметазон с противовоспалительной целью в более высокой дозировке (20 мг в сутки, 2 раза в день, парентерально) в сочетании с Омепразолом (20 мг, 2 раза в день, *per os*), продолжена антибактериальная терапия Цефтриаксоном в том же объеме (2,0 г, 2 раза в сутки, внутримышечно), в качестве меры профилактики тромбообразования был назначен Эноксапарин (0,4 мл, подкожно, 2 раза в сутки). Учитывая степень поражения легочной ткани, больная получала препарат экзогенного сурфактанта по 75 мг 2 раза в день через небулайзер на протяжении 3 дней. Для увеличения неспецифической резистентности назначен Витамин С (4,0 г, растворенные в 0,9% 250 мл NaCl, внутривенно капель-

но). По решению врачебной комиссии в качестве противовирусного препарата был назначен Ремдесивир (200 мг, растворенные в 0,9% 100 мл NaCl в первые сутки; начиная со вторых суток — по 100 мг + NaCl 0,9% 100 мл). Продолжена аппаратная НИВЛ через лицевую маску в режиме SPONT: Ps 10 см вод.ст., PEEP 8 см вод.ст., Vt 510–550 мл, FiO_2 — 70%. На этом фоне индекс оксигенации 204 мм рт.ст., SpO_2 97%, ЧДД 20 в минуту.

На 05.11 (2 день в ОРИТ, 9 день болезни) состояние расценивалось как тяжелое, стабильное. Было отмечено повышение артериального давления до 146/75 мм рт.ст., в связи с чем в перечень получаемых препаратов был добавлен Эналаприл (2,5 мг, 2 раза в сутки). В этот же день были выполнены биохимический анализ крови (увеличение СРБ до 60 мг/л), анализ на ферритин (250 мкг/л) и прокальцитониновый тест (< 0,5 нг/мл) — результаты исследований не позволяли исключить бактериальную инфекцию. Положительный результат исследования крови на антитела IgM и IgG к COVID-19 (от 05.11) подтвердил роль данного патогена в качестве этиологического фактора у конкретной пациентки.

Начиная с 06.11 (3 день в ОРИТ, 10 день болезни) пациентка переведена на ВПО (в режим HFlow, flow — 30 л/мин, FiO_2 — 35%) с сатурацией 97–98% и индексом оксигенации 207 мм рт.ст., а к 8.11 (5 день в ОРИТ, 12 день болезни) скорость потока увлажненного кислорода была уменьшена до 3–5 л/мин при респираторном индексе 405 мм рт.ст. и сатурации 97%. За 5 дней пребывания в ОРИТ (по 08.11) состояние пациентки было стабилизировано, отмечена положительная динамика в виде уменьшения клиники дыхательной недостаточности (снижение показателей респираторной поддержки, увеличение индекса оксигенации). Для последующего лечения пациентка переведена из реанимационного в инфекционное отделение ОГБУЗ «Медико-санитарная часть № 2».

В ОАК от 08.11 отмечено повышение гемоглобина (123 г/л), общее количество лейкоцитов было несколько выше порогового уровня, но выраженность воспалительной реакции снизилась (WBC — $9,7 \times 10^9$ /л, сдвиг формулы вправо за счет нейтрофилов — палочкоядерные не определялись, сегментоядерные — 72%; LYM — 20%; СОЭ — 20 мм/ч).

Положительная динамика клинической картины на фоне терапии четко прослеживалась с 9.11 (6 день госпитализации, 13 день болезни) преимущественно за счет уменьшения выраженности симптомов дыхательной недостаточности (отсутствовали жалобы на одышку, вспомогательная мускулатура в акте дыхания не участвовала, ЧДД 22 в минуту, SpO_2 97% на атмосферном кислороде; в респираторной поддержке более не нуждалась).

В БАК от 10.11 (7 день госпитализации, 14 день болезни) отмечалось уменьшение активности белка острой фазы (снижение ферритина до 108 мкг/л), что сочеталось с динамикой клинической картины заболевания.

В лабораторных анализах от 08.11 и 10.11 обращало на себя внимание повышение уровня глюкозы (11,9 и 16,1 ммоль/л соответственно), которое, вероятно, связано с назначением глюкокортикоидов. В связи с эти была проведена коррекция доз Дексаметазона (снижение до 12 мг/сутки) и назначен инсулин короткого действия Актропид в течении суток с трехкратным введением (1 доза — 6 ЕД, 2 и 3 дозы — по 4 ЕД).

На 14 день болезни (10.11, 7 день госпитализации) была выполнена спиральная компьютерная томография грудной клетки, где выявлены признаки двусторонней интерстициальной полисегментарной пневмонии (рис. 1–8). Форма грудной клетки описана как обычная. Легочные поля расправлены. На томограммах бронхиальное дерево визуализировано до субсегментов: сами бронхи не деформированы, их просвет в пределах нормы, устья свободны, проходимость сохранена на всем протяжении. Во всех сегментах с обоих сторон определялись полиморфные, сливные участки уплотнения легочной ткани по типу матового стекла с участками консолидации. На этом фоне были видны просветы бронхов. Определялись фиброзные тяжи в проекции апикальной плевры обоих легких. Контуры диафрагмы четкие, синусы свободные, свободная жидкость в плевральной полости отсутствовала. Трахея обычной формы и размеров, карина острая. Сосудистые структуры верхнего средостения с четкими контурами и нормального диаметра, стенки сосудов без кальцинатов. Медиастинальные лимфоузлы и лимфоузлы корней обоих легких (без контрастного усиления) визуализированы единично, не увеличены. Сердце расположено обычно, размеры в пределах нормы. Выявлены умеренные дегенеративно-дистрофические изменения грудного отдела позвоночника. Мягкие ткани грудной клетки без особенностей. По заключению врача-рентгенолога, объем пораженной легочной паренхимы достигал 95%. Наиболее вероятно, что патологический процесс у пациентки имел вирусную природу.

11.11 (16 день болезни, 8 день госпитализации) при определении РНК COVID-19 в мазках со слизистых оболочек методом ПЦР получен отрицательный результат.

В связи со стабилизацией клинической картины и положительной динамикой девушка

Рисунок 1. Томограмма легких на уровне ThIII
Figure 1. Lung tomogram at the ThIII level

Рисунок 2. Томограмма легких на уровне ThIV
Figure 2. Lung tomogram at the ThIV level

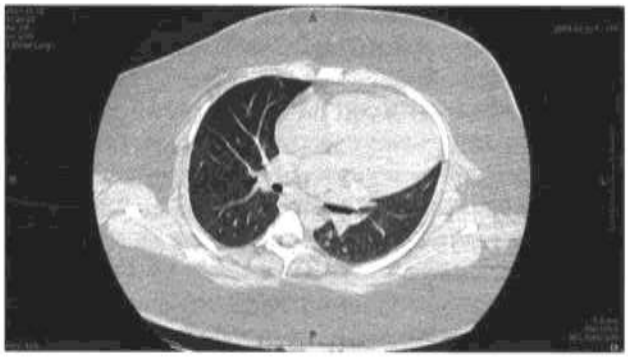


Рисунок 3. Томограмма легких на уровне ThV
Figure 3. Lung tomogram at the ThV level

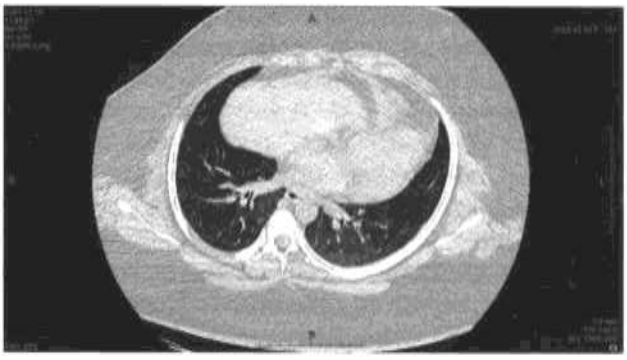


Рисунок 4. Томограмма легких на уровне ThVI
Figure 4. Lung tomogram at the ThVI level

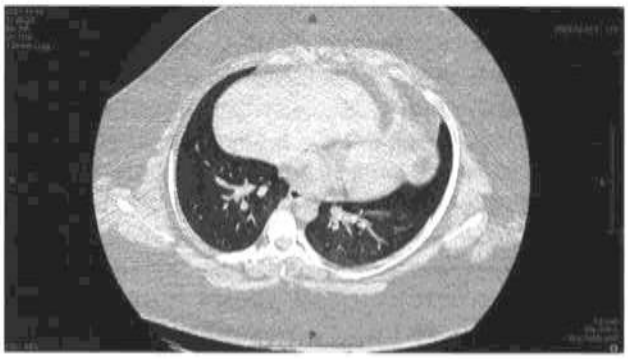


Рисунок 5. Томограмма легких на уровне ThVII
Figure 5. Lung tomogram at the ThVII level

Рисунок 6. Томограмма легких на уровне ThVIII
Figure 6. Lung tomogram at the ThVIII level

Рисунок 7. Томограмма легких на уровне ThIX
Figure 7. Lung tomogram at the ThIX level

Рисунок 8. Томограмма легких на уровне ThX
Figure 8. Lung tomogram at the ThX level

была переведена в детское инфекционное отделение для дальнейшего лечения и наблюдения.

На момент перевода больная жалоб не предъявляла. При физикальном обследовании определялось жестковатое дыхание, хрипы отсутствовали, вспомогательная дыхательная мускулатура в дыхании не участвовала. Сатурация при дыхании атмосферным воздухом достигала 99%. Артериальное давление сохранялось в оптимальных пределах (125/75 мм рт.ст., на фоне отмены Эналаприла).

Со стороны лабораторных показателей крови (от 12.11) наблюдалось уменьшение интенсивности воспалительной реакции (уровень СРБ снизился до 12 мг/л), но по прежнему сохранялся нейтрофильный лейкоцитоз (WBC 15,31 × 10^9; палочкоядерные — 6%, сегментоядерные — 74%). Последний можно трактовать как стероидный лейкоцитоз на фоне приема Дексаметазона. Контроль гликемии показал удовлетворительные результаты (от 12.11 — 6,1 ммоль/л), инсулин в стационаре более не получала. Однако, учитывая весь анамнез больной, нельзя с полной уверенность исключить нарушения толерантности к глюкозе, поэтому необходимо провести дополнительное обследование в амбулаторных и госпитальных условиях. Параметры других лабораторных анализов и инструментальных обследований были в пределах нормы.

Больная была выписана из стационара 15.11 (20 день болезни, 12 день госпитализации) с клиническим выздоровлением и рекомендацией дальнейшего наблюдения у участкового педиатра.

Заключение

Описание данного клинического случая наглядно демонстрирует исключение из существующей тенденции к более легкому течению новой коронавирусной инфекции у пациентов педиатрического профиля. Однако причиной развития такой тяжелой формы, безусловно, является преморбидный фон больной, а именно выраженное ожирение в сочетании с артериальной гипертензией. Наличие в анамнезе последних диктует необходимость верно оценивать и прогнозировать тяжесть новой коронавирусной инфекции даже у пациентов с изначально гладким течением заболевания. Стоит отметить, что назначение некоторых препаратов «off-label» (в данной клиническом случае это был Ремдесивир, назначенный по решению врачебной комиссии) может вносить свой вклад в исход болезни у конкретных больных. В связи с вышеизложенным, требуется достаточно полно учитывать все особенности анамнеза жизни и клинической картины у пациентов любого возраста.

Список литературы/References

1. ВОЗ. Заболевание COVID-19 у детей и подростков. Научная справка. 2021. 12 с. [WHO. COVID-19 disease in children and adolescents: Scientific brief. 2021. 12 p. *(In Russ.)*] *URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345575/WHO-2019-nCoV-Sci-Brief-Children-and-adolescents-2021.1-rus.pdf*
2. Демидова Т.Ю., Волкова Е.И., Грицкевич Е.Ю. Особенности течения и последствия COVID-19 у пациентов с избыточным весом и ожирением. Уроки текущей пандемии // Ожирение и метаболизм. 2020. Т. 17, № 4. С. 375–384. [Demidova T.Yu., Volkova E.I., Gritskevich E.Yu. Peculiarities of the COVID-19 course and consequences in overweight and obese patients. Lessons from the current pandemic. *Ozhirenie i metabolizm = Obesity and Metabolism, 2020. vol. 17, no. 4, pp. 375–384. (In Russ.)*] *doi: 10.14341/omet12663*
3. Канорский С.Г. COVID-19 и ожирение: что известно об особенностях патогенеза и лечения? // Южно-Российский журнал терапевтической практики. 2021. Т. 2, № 1. С. 17–23. [Kanorskii S.G. COVID-19 and obesity: what is known about the features of pathogenesis and treatment? *Yuzhno-Rossiiskii zhurnal terapevticheskoi praktiki = South Russian Journal of Therapeutic Practice, 2021, vol. 2, no. 1, pp. 17–23. (In Russ.)*] *doi: 10.21886/2712-8156-2021-2-1-17-24*
4. Лобанова О.А., Трусова Д.С., Руденко Е.Е., Проценко Д.Д., Коган Е.А. Патоморфология новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2020. Т. 35, № 3. С. 47–52. [Lobanova A.O., Trusova D.S., Rudenko E.E., Protsenko D.D., Kogan E.A. Pathomorphology of a new coronavirus infection COVID-19. *Sibirskii zhurnal klinicheskoi i eksperimental'noi meditsiny = The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2020, vol. 35, no. 3, pp. 47–52. (In Russ.)*] *doi: 10.29001/2073-8552-2020-35-3-47-52*
5. Особенности клинических проявлении и лечение заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) у детей: методические рекомендации. Версия 2 (03.07.2020). Министерство здравоохранения Российской Федерации. 73 с. [Features of clinical manifestations and treatment of the disease caused by a new coronavirus infection (COVID-19) in children: guidelines. Version 2 (07.03.2020). Ministry of Health of the Russian Federation. 73 p. *(In Russ.)*]. *URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/050/914/original/03062020_%D0%B4%D0%B5%D1%82%D0%B8_COVID-19_v2.pdf*
6. Соколовская В.В., Литвинова А.А., Крикова А.В., Козлов Р.С. Влияние морбидного ожирения на исход COVID-19 у ребенка // Детские инфекции. 2022. Т. 21, № 3. С. 47–51. [Sokolovskaya V.V., Litvinova A.A., Krikova A.V., Kozlov R.S. The effect of morbid obesity on the outcome of COVID-19 in a child. *Detskie infektsii = Children Infections, 2022, vol. 21, no. 3, pp. 47–51. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2022-21-3-47-51*
7. Gibson P.G., Qin L., Puah S.H. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Med. J. Aust., 2020, vol. 213, no. 2, pp. 54–56. doi: 10.5694/mja2.50674*

8. Oliveira da Silva Kist M.L., Hanzen Andrades G.R., Drumond Costa C.A., Crestani F., Ramos Garcia P.C. Weight excess association with severity in children and adolescents with COVID-19: a systematic review. *Clin. Nutr. ESPEN, 2022, no. 49, pp. 114–120. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.04.005*
9. Oualha M., Bendavid M., Berteloot L., Corsia A., Lesage F., Vedrenne M., Salvador E., Grimaud M., Chareyre J., de Marcellus C., Dupic L., de Saint Blanquat L., Heilbronner C., Drummond D., Castelle M., Berthaud R., Angoulvant F., Toubiana J., Pinhas Y., Frange P., Chéron G., Fourgeaud J., Moulin F., Renolleau S. Severe and fatal forms of COVID-19 in children. *Arch. Pediatr., 2020, vol. 27, no. 5, pp. 235–238. doi: 10.1016/j.arcped.2020.05.010*

Авторы:
Самойлов К.В., лаборант-исследователь кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия
Ермолаева Ю.А., к.м.н., доцент кафедры педиатрии с курсом эндокринологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Пономарева Д.А., к.м.н., доцент кафедры педиатрии с курсом эндокринологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Худякова А.А., студентка VI курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Проценко А.В., ординатор по специальности «Педиатрия» ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Россия.

Authors:
Samoylov K.V., Research Laboratory Assistant, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;
Ermolaeva Yu.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pediatrics with a Course of Endocrinology, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;
Ponomareva D.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pediatrics with a Course of Endocrinology, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;
Khudyakova A.A., 6th Year Student, Pediatric Faculty, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russian Federation;
Protsenko A.V., Resident Physician in Pediatrics, Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.12.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 30.12.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 183–190

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 183–190

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ИНФИЦИРОВАНИЯ SARS-CoV-2, ОСЛОЖНЕННОГО НЕФРОГЕННЫМ ОТЕКОМ ЛЕГКИХ И COVID-АССОЦИИРОВАННЫМ ПНЕВМОНИТОМ, АЛЬВЕОЛИТОМ

О.В. Воробьева, Н.Е. Гималдинова, Л.П. Романова

ФГОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

Резюме. COVID-19 — заболевание с высокой степенью передачи, особенно тяжело протекающий у пациентов с нефрогенной гипертензивной болезнью и хронической болезнью почек, так как у них частота инфекций всех видов выше, чем в общей популяции. Цель исследования — описание клинического случая инфицирования SARS-CoV-2, осложненного нефрогенным отеком легких и COVID-ассоциированным пневмонитом, альвеолитом. Больная К.С., 1975 г. рожд., в течение суток находилась на стационарном лечении в Больнице скорой медицинской помощи в связи с жалобами на повышение артериального давления до 180–200/110–120 мм рт.ст., температуры до 38,7°С, сухой кашель, чувство тяжести в грудной клетке, изменение цвета мочи. Диагноз COVID-19 был подтвержден при исследовании назофарингеального мазка методом ПЦР. По данным компьютерной томографии выявлена картина двустороннего COVID-ассоциированного пневмонита, альвеолита, с поражением 75%. На электрокардиограмме выявлены признаки гипертрофии миокарда левого желудочка. По результатам ультразвукового обследования определялись многочисленные кисты в почках. Общий анализ мочи при поступлении в стационар: лейкоциты — 499, эритроциты — 386. Скорость клубочковой фильтрации (CKD-EPI: 29 мл/мин/1,73 м^2) соответствовала IV стадии хронической болезни почек. По данным коагулограммы: фибриноген: 32,3 (1,6–4,0) г/л, D-димер: 663 (0–250). Несмотря на проводимое лечение, состояние пациентки ухудшалось, нарастали явления сердечно-легочной и почечной недостаточности, что привело к летальному исходу. При вирусологическом исследовании секционного материала: РНК коронавируса SARS-CoV-2 была обнаружена в легком и почках. Выявлены признаки двустороннего COVID-ассоциированного пневмонита, альвеолита с диффузными клеточными инфильтратами в сочетании с изменениями со стороны альвеолярного аппарата, признаками отека легких. Со стороны сердца — отек интерстиция, мышечные волокна фрагментированные, часть из них — гипертрофирована, отмечалась волнообразная деформация кардиомиоцитов, смазанность поперечной исчерченности. Артерии с утолщенными склерозированными стенками. В почках — диффузное повреждение проксимальных канальцев нефрона с участками кортикального и проксимального некронефроза, участками фибриноидного набухания. *Заключение.* Причиной смерти пациентки 45 лет, явилось

Адрес для переписки:
Воробьева Ольга Васильевна
428015, Россия, г. Чебоксары, Московский пр., 15,
ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет
им. И.Н. Ульянова.
Тел.: 8 927 858-05-18 (моб.).
E-mail: olavorobeva@mail.ru

Contacts:
Olga V. Vorobeva
428045, Russian Federation, Cheboksary, Moskovskii pr., 15,
I.N. Ulyanov Chuvash State University.
Phone: +7 927 858-05-18 (mobile).
E-mail: olavorobeva@mail.ru

Для цитирования:
Воробьева О.В., Гималдинова Н.Е., Романова Л.П. Клинический случай инфицирования SARS-CoV-2, осложненного нефрогенным отеком легких и COVID-ассоциированным пневмонитом, альвеолитом // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 183–190. doi: 10.15789/2220-7619-ACC-1985

Citation:
Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P. A clinical case of SARS-CoV-2 infection complicated by nephrogenic pulmonary edema and COVID-associated pneumonitis, alveolitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 183–190. doi: 10.15789/2220-7619-ACC-1985

© Воробьева О.В., Гималдинова Н.Е., Романова Л.П., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ACC-1985

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

тяжелое течение двустороннего COVID-ассоциированного пневмонита, альвеолита, способствовавшего развитию ренальной медуллярной гипоксии и кардио-ренальному синдрому 1 типа, которые привели к раннему нефрогенному отеку легких.

Ключевые слова: *COVID-19, нефрогенный отек легких, поликистоз, почки, пневмонит, альвеолит.*

A CLINICAL CASE OF SARS-CoV-2 INFECTION COMPLICATED BY NEPHROGENIC PULMONARY EDEMA AND COVID-ASSOCIATED PNEUMONITIS, ALVEOLITIS

Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.

Chuvash State University after I.N. Ulyanova, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. COVID-19 is a highly transmissible disease with severe course especially in patients with nephrogenic hypertensive disease and chronic kidney disease due to a higher incidence of all-type infections than in the general population. The aim of the study is to describe a clinical case of SARS-CoV-2 infection complicated by nephrogenic pulmonary edema and COVID-associated pneumonitis, alveolitis. Description of the case. Patient K.S., born in 1975, was hospitalized 24 hours after symptom onset at emergency hospital due to complaints of increased blood pressure up to 180–200/110–120 mm Hg, temperature up to 38.7°C, dry cough, feeling of heaviness in the chest, change in urine color. PCR smear for SARS-CoV-2 was positive. Computed tomography revealed a pattern of bilateral COVID-associated pneumonitis, alveolitis, with 75% involvement. The electrocardiogram revealed signs of left ventricular myocardial hypertrophy. Ultrasound examination showed numerous cysts in the kidneys. Urinalysis at admission: leukocytes — 499, erythrocytes — 386. Glomerular filtration rate (CKD-EPI: 29 ml/min/1.73 m^2) and corresponds to stage IV of chronic kidney disease. Coagulogram: fibrinogen: 32.3 (1.6–4.0) g/l, D-dimer: 663 (0–250). Despite the treatment, the patient's condition worsened, the phenomena of cardiopulmonary and renal insufficiency increased, which led to a fatal outcome. During a virological study of sectional material: SARS-CoV-2 coronavirus RNA was found in the lung and kidneys. Signs of bilateral COVID-associated pneumonitis, alveolitis with diffuse cellular infiltrates in combination with changes in the alveolar apparatus, signs of pulmonary edema were revealed. Heart-related signs — swelling of the interstitium, fragmented muscle fibers, some of them hypertrophied, a wave-like deformation of cardiomyocytes, blurring of the transverse striation. Arteries with thickened sclerosed walls. In the kidneys — diffuse damage to the proximal tubules of the nephron with areas of cortical and proximal necronephrosis, areas of fibrinoid swelling. *Conclusion.* The cause of death of a 45-year-old patient was a severe course of bilateral COVID-associated pneumonitis, alveolitis, which contributed to the development of renal medullary hypoxia and type 1 cardiorenal syndrome, which led to early nephrogenic pulmonary edema.

Key words: *COVID-19, nephrogenic lung edema, polycystic disease, kidneys, pneumonitis, alveolitis.*

Введение

В настоящее время продолжается интенсивное изучение клинических и эпидемиологических особенностей коронавирусной инфекции, разработка новых средств его профилактики и лечения. Наиболее распространенным клиническим проявлением нового варианта коронавирусной инфекции является вирусный COVID-ассоциированный пневмонит, альвеолит, у 3–4% пациентов зарегистрировано развитие острого респираторного дистресс-синдрома [4, 8]. У части больных развивается гиперкоагуляционный синдром с тромбозами и тромбоэмболиями, поражаются центральная нервная система, миокард, почки, печень, желудочно-кишечный тракт, эндокринная и иммунная системы [2, 3]. Однако основной и быстро достижимой мишенью SARS-CoV-2 являются альвеолярные клетки II типа легких, что определяет развитие диффузного альвеолярного повреждения [9, 10, 12].

Между почками и легкими имеется тесная функциональная взаимосвязь, которая делает их наиболее вовлеченными в синдром полиорганной недостаточности. Сочетание острого повреждения легких и почечной недостаточности приводит к смертности в 80% случаев. В результате острого повреждения почек (ОПП) происходит увеличение циркулирующих цитокинов, хемокинов, активированных врожденных иммунных клеток и их диффузия в другие органы, в том числе — в легкие. Эти факторы инициируют патологический каскад, который в конечном итоге приводит к острому повреждению легких в виде нефрогенного отека и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).

Наличие заболевания почек является не только фактором риска инфицирования SARS-CoV-2 вследствие высокой экспрессии ACE2 в различных отделах нефрона, но фактором осложненного течения данного вирусного

заболевания. Одним из таких распространенных заболеваний почек является поликистоз. Он составляет около 12–15% среди всех урологических заболеваний. Кисты образуются из-за повышенной пролиферации и дифференцировки эпителия канальцев нефрона. Кисты в почке, как правило, возникают фокально, и из-за увеличения объема кист происходит сдавление соседних здоровых нефронов; постепенно почка теряет фильтрующую функцию. Помимо основного заболевания у больных с кистозной болезнью появляются нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы в виде нефрогенной гипертензии [1, 5, 14].

Поражение почек при COVID-19 может рассматриваться как следствие действия комплекса механизмов, индуцированных вирусом SARS-CoV-2. Выделяют несколько патофизиологических механизмов. Первый включает цитопатический эффект SARS-CoV-2 на почечный эпителий с развитием острого тубулонекроза и иммуноопосредованного повреждения почечного интерстиция [7, 11]. Второй представляет собой синдром цитокинового шторма, возникающий как следствие гиперактивации иммунной системы с развитием острого почечного и мультиорганного воспалительного повреждения, чему сопутствуют гипоксия, гиперактивация каскада коагуляции и нарушения микроциркуляции. В связи с актуальностью и глобальностью проблемы, цель исследования — описание клинического случая осложненного течения инфицирования SARS-CoV-2 у пациента с поликистозом почек.

Описание случая

Больная К.С., 1975 г. рожд., доставлена бригадой скорой медицинской помощи в диагностическое отделение Больницы скорой медицинской помощи по экстренным показаниям. Жалобы при поступлении на повышение АД до 180–200/110–120 мм рт.ст., которое ощущалось в виде интенсивной головной боли, подъем температуры до 38,7°С, сухой кашель, преимущественно в ночные часы, чувство тяжести в грудной клетке, боли в поясничной области, изменение цвета мочи. Повышение АД стала отмечать в последние две недели до поступления в стационар, несмотря на постоянный прием физиноприла по 30 мг в сутки в 2 приема. До ухудшения состояния «нормальным» для себя считала АД в пределах 130/80–90 мм рт.ст. Была проведена компьютерная томография (КТ) органов грудной клетки, выявлены двусторонний диффузный COVID-ассоциированный пневмонит, альвеолит, процент поражения — 75; двусторонний гидроторакс. ПЦР мазка из носоглотки на коронавирусную инфекцию положительная.

Из данных анамнеза известно, что находилась на диспансерном наблюдении у терапевта по месту жительства по поводу поликистоза почек около 15 лет.

При объективном осмотре: в легких — дыхание ослабленное везикулярное с жестким оттенком, укорочение перкуторного звука, мелкопузырчатые хрипы. Частота дыхательных движений 32–36 в минуту. Со стороны сердечно-сосудистой системы. Ослаблен I тон сердца, выслушивался систолический шум на верхушке, частота сердечных сокращений 102 уд/мин, 1–2 экстрасистолы в минуту. Артериальное давление 160/100 мм рт. ст. Со стороны пищеварительной системы. Язык обложен белым налетом. Живот мягкий, при пальпации безболезненный. Печень на 3 см ниже края реберной дуги, безболезненная, край печени несколько уплотненный. Симптом поколачивания по области почек — определяется болезненность. Выявляются отеки голеней и стоп. Сатурация 40%.

Проведенные обследования при поступлении: в общем анализе крови отмечаются признаки лейкоцитоза и повышенное СОЭ (табл. 1, 2).

Биохимический анализ крови: мочевина — 12,1 ммоль/л, креатинин — 179,0 мкмоль/л, С-реактивный белок — 52 мг/л, кальций общий — 1,93 ммоль/л, альбумин — 25,5 г/л, ферритин — 376,9 нг/мл, лактатдегидрогеназа — 435,0 Ед/л.

Коагулограмма: протромбиновый индекс: 94,7%, фибриноген: 35,3 г/л, МНО: 1,03, АЧТВ: 23,6 с, протромбиновое время: 11,1 с, D-димер: 763.

Общий анализ мочи: лейкоциты: 499, эритроциты: 386, бактерии: ++++. Скорость клубочковой фильтрации (CKD-EPI): 29 мл/мин/1,73 м^2, снижена и соответствует IV стадии ХБП.

Динамика изменений лабораторных показателей общего анализа крови и лейкоцитарной формулы на 2-е сутки представлена в табл. 3 и 4.

Биохимический анализ крови: мочевина: 15,1 ммоль/л, креатинфосфокиназа — МВ: 40,0 Ед/л, креатинин: 187,0 мкмоль/л, С-реактивный белок: 64 мг/л, ферритин: 469,8 нг/мл, лактатдегидрогеназа: 552,0 Ед/л.

Коагулограмма: протромбиновый индекс: 89,4%, фибриноген: 32,3 г/л, МНО: 1,15, АЧТВ: 20,3 с, протромбиновое время: 12,3 с, D-димер: 663.

Таблица 1. Общий анализ крови при поступлении в стационар
Table 1. General blood analysis on admission to the hospital

Показатели Parameter	**Лейкоциты** Leukocytes	**Эритроциты** Erythrocytes	**Гемоглобин** Hemoglobin	**Тромбоциты** Platelets	**Скорость оседания эритроцитов** Sedimentation rate
У пациентки In patient	13,08 × 10^9/л	4,03 × 10^9/л	126 г/л	346 × 10^9/л	40 мм/ч
Референсные Referenced	3,80–8,76	4,54–6,00	120–147	173–360	2–8

Таблица 2. Лейкоцитарная формула при поступлении в стационар
Table 2. Leukocyte formula on admission to the hospital

Показатели Parameter	**Нейтрофилы** Neutrophils	**Лимфоциты** Lymphocytes	**Моноциты** Monocytes	**Эозинофилы** Eosinophils
У пациентки In patient	9,81 × 10^9/л	11,70 × 10^9/л	1,44 × 10^9/л	0,13 × 10^9/л
Референсные Referenced	1,50–5,00	1,05–2,87	0,22–0,63	0,03–0,27

Общий анализ мочи: pH — 5.0, лейкоциты — 386, эритроциты — 289. Скорость клубочковой фильтрации (CKD-EPI): 28 мл/мин/м^2.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости и почек: печень размерами 30 × 17 × 13 × 10 × 9 см. В правой доле отмечаются множественные бугорки (кистозные полости) в диаметре от 0,5 до 4 см, выявляется незначительный перипортальный фиброз. Размеры почек: правая 14 × 10 × 8 см, левая 18 × 10 × 8 см. В почечной паренхиме располагаются округлые образования (кисты), размерами до 2 см. Толщина слоя паренхимы составляет 30 мм.

ЭхоКГ: аорта 35 мм, левое предсердие 43 мм, толщина межжелудочковой перегородки 10 мм, толщина задней стенки 10 мм, конечно-систолический размер 30 мм, конечно-диастолический размер 50 мм, фракция выброса 70%, индекс массы миокарда левого желудочка 127,7 г/м^2.

Электрокардиография: а) отклонение электрической оси влево (от 00 до –900); б) RI > 10 мм; в) S (Q) avr > 14 мм; г) Tavr > 0 при S (Q) ≥ Ravr; д) Rv5, v6 > 16 мм; е) Ravl > 7 мм; ж) Tv5, v6 ≤ 1 мм; при Rv5, v6 > 10 мм и Tv1-v4 > 0.

Проводилось комплексное лечение (согласно клиническим рекомендациям): противовирусные, антагонисты рецепторов IL-6, антикоагулянты, ГКС. Состояние больной прогрессивно ухудшалось, нарастали явления сердечно-легочной и почечной недостаточности. Реанимационные мероприятия проводились в течение 30 мин, без эффекта. Кожные

Таблица 3. Общий анализ крови на 2-е сутки пребывания в стационаре
Table 3. General blood analysis on the 2nd day of hospital stay

Показатели Parameter	**Лейкоциты** Leukocytes	**Эритроциты** Erythrocytes	**Гемоглобин** Hemoglobin	**Тромбоциты** Platelets	**Скорость оседания эритроцитов** Sedimentation rate
У пациентки In patient	11,30 × 10^9/л	3,85 × 10^9/л	126 г/л	215 × 10^9/л	37 мм/ч
Референсные Referenced	3,80–8,76	4,54–6,00	120–147	173–360	2–8

Таблица 4. Лейкоцитарная формула на 2-е сутки пребывания в стационаре
Table 4. Leukocyte formula on the 2nd day of hospital stay

Показатели Parameter	**Нейтрофилы** Neutrophils	**Лимфоциты** Lymphocytes	**Моноциты** Monocytes	**Эозинофилы** Eosinophils
У пациентки In patient	9,83 × 10^9/л	0,79 × 10^9/л	0,57 × 10^9/л	0,11 × 10^9/л
Референсные Referenced	1,50–5,00	11,05–2,87	0,22–0,63	0,03–0,27

покровы стали цианотичными, самостоятельное дыхание, сознание отсутствовало, арефлексия, атония, пульс на магистральных сосудах не пальпировался, по данным ЭКГ — асистолия. Констатирована смерть.

Выставлен заключительный клинический диагноз. Основное заболевание: Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован (U07.1). Конкурирующее заболевание: Поликистоз почек, взрослый тип. ХБП 4 стадия. Сопутствующее заболевание: Гипертоническая болезнь II ст, АГ III ст. ГЛЖ. Риск III. Осложнения основного заболевания: Двусторонний диффузный вирусный COVID-ассоциированный пневмонит, альвеолит. КТ-3, процент поражения 75%. ОРДС тяжелой степени, ОССН.

В связи с констатацией смерти направлена на патологоанатомическое исследование.

При секционном исследовании верхних дыхательных путей: слизистые оболочки трахеи, бронхов отечные, розовые, с мелкими точечными кровоизлияниями. В плевральных полостях по 200 мл розовой прозрачной жидкости. Легкие тяжелые, отмечается их резкое полнокровие и диффузное уплотнение. При гистологическом исследовании преобладают участки дистелектаза в виде обширных полей, альвеолы неравномерно расправлены, оголенные базальные мембраны, в просвете альвеол серозно-фибринозный экссудат, слущенные альвеолоциты и макрофаги (рис. 1, вклейка, с. II), на местах оголенной базальной мембраны наложения гомогенных розовых масс в виде «полулуний» по типу гиалиновых мембран (рис. 2А, вклейка, с. II). Выявлялось неравномерное скопление эритроцитов в просветах альвеол: от небольшого числа до полного их заполнения (рис. 2Б, вклейка, с. II). Отмечался интраальвеолярный отек; десквамация альвеолярного (в виде отдельных клеток и их пластов) и бронхиолярного эпителия; появление крупных, неправильной формы альвеоцитов II типа, с увеличенными ядрами с грубозернистым хроматином и отчетливыми ядрышками.

В полости перикарда небольшое количество прозрачной желтоватой жидкости, листки перикарда влажные, гладкие, под эпикардом умеренное отложение жировой клетчатки. Сердце размерами 12 × 10 × 7 см, массой 270 г. Венечные артерии магистрального типа, в просвете их жидкая кровь, стенки режутся с хрустом, на интиме липосклеротические наложения. В полостях сердца красные посмертные свертки и жидкая кровь, полости не расширены, эндокард влажный, гладкий. На клапанах сердца имеются атеросклеротические наложения, которые придают местами ригидность, подвижность клапанов сохранена, смыкаются плотно, сухожильные нити тонкие, гладкие. Миокард — дряблый, на разрезах красно-коричневый, с серо-белесоватыми периваскулярными прожилками. Толщина миокарда правого желудочка сердца — 0,3 см, левого — 1,6 см. При гистологическом исследовании: умеренный отек интерстиция, мышечные волокна неравномерно фрагментированы, дистрофические изменения кардиомиоцитов, вакуолизация цитоплазмы, волнообразная деформация кардиомиоцитов, смазанность поперечной исчерченности, кардиомиоциты незначительно гипертрофированы, отмечается мелкосетчатое разрастание соединительной ткани. Артерии с утолщенными склерозированными стенками (рис. 3, вклейка, с. II).

Паранефральная клетчатка выражена хорошо, почки бобовидной формы, размерами правая 14 × 10 × 8 см (масса — 280 г), левая 18 × 10 × 8 см (масса — 370 г). Фиброзная капсула снимается тяжело, поверхность почек бугристая. На разрезах анатомическое строение стерто, вещество почек представлено в виде множественных кистозных полостей в диаметре до 2 см, с мутноватым сероватого цвета содержимым, местами с сохранением почечной паренхимы. Слизистая чашек и лоханок серо-белесоватая с полнокровными сосудами, единичными мелкоточечными кровоизлияниями под слизистой. При гистологическом исследовании: капсула почек разрыхлено-набухшая, строма отечная, капилляры клубочков, стромы коры и мозгового слоя неравномерно полнокровные. Канальцы местами расширены, выполнены гомогенной розовой массой, эпителий в них с дистрофически-атрофическими, некротическими изменениями. В паренхиме почки имеются радиально расположенные расширенные собирательные канальцы, которые образуют почечные кисты диаметром до 2 см, между которыми выявляются сохраненные клубочки и канальцы, множественные мелкие кисты выстланы низким кубическим эпителием, содержащие жидкость (рис. 4А, III обложка). Определяется интерстициальный фиброз паренхимы почек, клубочки и канальцы очагово атрофированы, склерозированы (рис. 4Б, III обложка).

Стенки артерий циркулярно склеротически утолщены (рис. 4В, III обложка), стенки артериол циркулярно гиалинизированы. Выявляются участки фибриноидного и, местами, мукоидного набухания с феноменом метахромазии в стенках сосудов. В просвете кап-

сулы клубочка определяются белковые массы (рис. 4Г, III обложка). Определяется диффузное повреждение проксимальных канальцев нефрона с признаками вакуольной дегенерации эпителиоцитов, участками кортикального и проксимального некронефроза.

Мягкие ткани живота отечные, умеренно полнокровные. В брюшной полости следы прозрачной желтоватой жидкости. Печень размерами 30 × 17 × 13 × 10 × 9 см, нижний край закруглен, на 3 см ниже уровня края реберной дуги. В правой доле отмечаются множественные бугорки, на разрезах представляют из себя кистозные полости в диаметре от 0,5 до 4 см. Вещество печени на разрезах желто-красного цвета, полнокровное. При гистологическом исследовании: зернистая и умеренно выраженная диффузно-очаговая жировая дистрофия гепатоцитов, портальные тракты не расширены, с умеренной круглоклеточной инфильтрацией. Имеются множественные билиарные кисты, местами окруженные зоной склероза (рис. 5, III обложка).

Результат вирусологического исследования биоматериала: обнаружена РНК SARS-CoV-2. Результат вирусологического исследования секционного материала в лаборатории вирусологических исследований и диагностики особо опасных инфекций: РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена в легком, почках.

Выставлен патологоанатомический диагноз. Основное заболевание: Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (результат вирусологического исследования биоматериала: РНК SARS-CoV-2 обнаружена. Результат вирусологического исследования секционного материала («Лаборатория вирусологических исследований и диагностики особо опасных инфекций»): РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена в ткани легкого, почки. Фоновое заболевание: Двусторонний поликистоз почек, взрослый тип. Нефрогенная гипертензивная болезнь: концентрическая гипертрофия миокарда (масса сердца 270 г, толщина стенки левого желудочка — 1,6 см, правого — 0,3 см), артериолосклероз, гломерулосклероз. Осложнения основного заболевания: Отек легких. Двусторонний диффузный вирусный COVID-ассоциированный пневмонит, альвеолит. Острый респираторный дистресс синдром взрослых. Хроническая почечная недостаточность с участками острого некронефроза: ангиосклероз, гломерулосклероз, нефросклероз, очаговый кортикальный и канальцевый некронефроз (биохимия крови: Мочевина: 15,1 ммоль/л, Креатинин: 187,0 мкмоль/л). Двусторонний гидроторакс. Асцит. Анасарка. Дистрофия паренхиматозных органов. Сопутствующее заболевание: Поликистоз правой доли печени, гистологический вариант: серозная киста.

Обсуждение

Морфологическим субстратом почечной патологии у пациентов, умерших от COVID-19 с признаками нефроангиосклероза, в подавляющем большинстве случаев является острое повреждение канальцевого эпителия, которое способствует развитию тяжелой хронической почечной недостаточности и нефрогенного отека легких [6].

Исход лечения нефрогенного отека легких зависит от нескольких факторов: от возраста больного, характера основного заболевания, сопутствующей патологии и ведущего патогенетического механизма. Наиболее тяжело протекает и поддается купированию отек легких, связанный с повышенной проницаемостью легочных капилляров и снижением онкотического давления плазмы крови. Наличие фонового заболевания почек у пациентки, такого как кистозная болезнь, привело к развитию нефрогенной гипертензии, изменениям со стороны сердечно-сосудистой системы, что усугубило течение COVID-19. Известно, что развитие тяжелого острого канальцевого некроза с явлениями кариолизиса и отслойкой тубулоцитов от тубулярной базальной мембраны отмечается в 60% случаев у пациентов с ОПП и 31% случаев при отсутствии сопутствующей патологии почек. Дистрофия канальцевого эпителия по типу неизометрической вакуолизации, выраженное венозное полнокровие со стазами крови в перитубулярных капиллярах и венулах, полнокровие клубочков и образованием в них эритроцитарных сладжей и стазов крови без явлений тромбоза и фибриноидного некроза приводит к изменению биохимических показателей, повышению креатинина, мочевины, снижению уровня альбуминов в крови [13]. В представленном случае у пациентки с нефрогенной гипертензивной болезнью и поликистозом почек, инфицированной SARS-CoV-2, помимо острого канальцевого некроза отмечался двусторонний некроз коркового слоя почек при сохранности интермедиарной зоны и пирамид; выявлялись умеренные признаки венозного полнокровия с эритроцитарными стазами, определялись участки фибриноидного и, местами, мукоидного набухания с феноменом метахромазии в стенках сосудов. Выявлялись признаки сердечной не-

достаточности, морфологически проявляющиеся отеком интерстиция, фрагментацией мышечных волокон, дистрофическими изменениями кардиомиоцитов, вакуолизацией цитоплазмы, волнообразной деформацией кардиомиоцитов, смазанностью поперечной исчерченности.

В легких определялись диффузные клеточные инфильтраты в сочетании с изменениями со стороны альвеолярного аппарата с развитием ОРДС и нефрогенного отека легких. Сочетание вирусного воспаления COVID-19, снижения легочных объемов, повышения гидростатического давления в сосудах микроциркуляторного русла и снижение онкотического давления привело к раннему развитию ОРДС и отеку легких.

Заключение

Пациенты с ранее существовавшим заболеванием почек или хронической болезнью почек (ХБП) имеют повышенный риск неблагоприятного исхода инфекции COVID-19. Причиной смерти пациентки 45 лет явилось тяжелое течение двустороннего COVID-ассоциированного пневмонита, альвеолита, способствовавшего развитию ренальной медуллярной гипоксии и кардио-ренальному синдрому I типа, которые привели к раннему нефрогенному отеку легких.

Список литературы/References

1. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Состояние заместительной терапии больных с хронической почечной недостаточностью в Российской Федерации в 1998–2007 г. (аналитический отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии) // Нефрология и диализ. 2009. Т. 11, № 3. С. 144–233. [Bikbov B.T., Tomilina N.A. Status of renal replacement therapy in ESRD patients of Russian Federation in 1998–2007 (analytic report of Russian RRT Register). *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis, 2009, vol. 11, no. 3, pp. 144–233. (In Russ.)*]
2. Воробьева О.В., Ласточкин А.В. Изменения в головном мозге, легких и сердце при COVID-19 на фоне цереброваскулярной патологии // Профилактическая медицина. 2020. Т. 23, № 7. С. 43–46. [Vorobeva O.V., Lastochkin A.V. Changes in the brain, lungs and heart with COVID-19 against the background of cerebrovascular pathology. *Profilakticheskaya Meditsina = The Russian Journal of Preventive Medicine, 2020, vol. 23, no. 7, pp. 43–46. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/profmed20202307143*
3. Воробьева О.В., Ласточкин А.В. Острый инфаркт миокарда и коронавирусная инфекция (COVID-19) // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021. Т. 10, № 1. С. 93–97. [Vorobeva O.V., Lastochkin A.V. Acute myocardial infarction and coronavirus infection (COVID-19). *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2021, vol. 10, no. 1, pp. 93–97. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/2305-3496-2021-10-1-93-97*
4. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 от 22.02.2022. М., 2022. 233 с. [Interim guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 15 dated 22.02.2022. Moscow, 2022. 233 p. *(In Russ.)*]
5. Клинические рекомендации. Хроническая болезнь почек (ХБП). Кодирование по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем: N18.1/N18.2/N18.3/N18.4/N18.5/N18.9 с кодами осложнений и ассоциированных состояний (при наличии) Z49.0/Z49.1/Z49.2/D63.8*/E87.2/E87.5/E21.1/E83.3/E83.5/E83.8/N25.0/E89.2 Возрастная группа: взрослые. Год утверждения: 2021 (пересмотр каждые 3 года). Разработчик клинической рекомендации: Ассоциация нефрологов. 231 с. [Clinical guidelines. Chronic kidney disease (CKD). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems coding: N18.1/N18.2/N18.3/N18.4/N18.5/N18.9 with codes for complications and associated conditions (if any) Z49.0/Z49.1/Z49.2/D63.8*/E87.2/E87.5/E21.1/E83.3/E83.5/E83.8/N25.0/E89.2 Age group: adults Approved year: 2021 (revised every 3 years). Clinical guideline developer: Association of Nephrologists. 231 p. *(In Russ.)*]
6. Патологическая анатомия легких при COVID-19: атлас / Под ред. О.В. Зайратьянца. Рязань: Рязанская областная типография, 2020. 57 с. [Pathological anatomy of the lungs in COVID-19: atlas. Ed. by O.V. Zayrat'yants. *Ryazan': Ryazanskaya oblastnaya tipografiya, 2020. 57 p. (In Russ.)*]
7. Столяревич Е.С., Фролова Н.Ф., Артюхина Л.Ю., Варясин В.В. Поражение почек при COVID-19: клинические и морфологические проявления почечной патологии у 220 пациентов, умерших от COVID-19 // Нефрология и диализ. 2020. Т. 22 (Спецвыпуск). С. 46–55. [Stolyarevich E.S., Frolova N.F., Artyukhina L.Yu., Varyasin V.V. Kidney damage in COVID-19: clinical and morphological manifestations of renal pathology in 220 patients who died from COVID-19. *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis, 2020, vol. 22 (special iss.), pp. 46–55. (In Russ.)*] *doi: 10.28996/2618-9801-2020-Special_Issue-46-55*
8. Халирахманов А.Ф., Гатиятуллина Г.Д., Гайфуллина Р.Ф., Ризванов А.А., Мухаметшина Э.И. Повреждение миокарда у пациентов с COVID-19 // Практическая медицина. 2020. Т. 18, № 1. С. 60–64. [Khalirakhmanov A.F., Gatuyatullina G.D., Gaifullina R.F., Rizvanov A.A., Mukhametshina E.I., Sharafutdinov B.M., Zinchenko S.V. Myocardial injury in patients with COVID-19. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine, 2020, vol. 18, no. 1, pp. 60–64. (In Russ.)*] *doi: 10.32000/2072-1757-2020-1-60-6*
9. Cheng H., Wang Y., Wang G.Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J. Med. Virol., 2020, vol. 92, no. 7, pp. 726–730. doi: 10.1002/jmv.25785*
10. Chen L., Li X., Chen M., Feng Y., Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc. Res., 2020, vol. 116, no. 6, pp. 1097–1100. doi: 10.1093/cvr/cvaa078*
11. Herrera-Gómez F., Chimeno M.M., Martín-García D., Lizaraso-Soto F., Maurtua-Briseño-Meiggs Á., Grande-Villoria J., Bustamante-Munguira J., Alamartine E., Vilardell M., Ochoa-Sangrador C., Álvarez F.J. Cholesterol-lowering treatment in chronic kidney disease: multistage pairwise and network meta-analyses. *Sci. Rep., 2019, vol. 9, no. 1: 8951. doi: 10.1038/s41598-019-45431-5*

12. Palmer S.C., Navaneethan S.D., Craig J.C., Johnson D.W., Perkovic V., Hegbrant J., Strippoli G.F. HMG CoA reductase inhibitors (statins) forpeople with chronic kidney disease not requiring dialysis. *Cochrane Database Syst. Rev., 2014, no. 5: CD007784. doi: 10.1002/14651858.CD007784.pub2*
13. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet, 2020, vol. 395, no. 10234, pp. 1417–1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5*
14. Zhang X., Xiang C., Zhou Y.H., Jiang A., Qin Y.Y., He J. Effect of statins on cardiovascular events in patients with mild to moderate chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *BMC Cardiovasc. Disord., 2014, vol. 14: 19. doi: 10.1186/1471-2261-14-19*

Авторы:
Воробьева О.В., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия;
Гималдинова Н.Е., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия;
Романова Л.П., к.б.н., доцент кафедры дерматовенерологии с курсом гигиены ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия.

Authors:
Vorobeva O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation;
Gimaldinova N.E., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation;
Romanova L.P., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Dermatovenerology and Hygiene, Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.06.2022
Отправлена на доработку 20.08.2022
Принята к печати 11.02.2023

Received 21.06.2022
Revision received 20.08.2022
Accepted 11.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 1, pp. 191–196

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 1, с. 191–196

МЕТОД СЕЛЕКТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ *ACINETOBACTER BAYLYI* ИЗ РЕЧНОЙ ВОДЫ

Е.П. Сиволодский[1,2], Л.А. Краева[1,2], Е.В. Мельникова[1]

[1] ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — повышение селективности выделения бактерий *Acinetobacter baylyi* из речной воды. При разработке селективной среды использовали 5 штаммов *A. baylyi*, из них 4 были выделены из воды реки Невы, 1 — из клинического материала. Штаммы *A. baylyi* идентифицировали по комплексу фенотипических признаков и/или с помощью масс-спектрометрического метода (MALDI-ToF MS). В предварительных исследованиях было установлено, что бактерии *A. baylyi* не утилизируют L-фенилаланин в качестве единственного источника углерода и азота, а также в качестве единственного источника углерода на среде с минеральными источниками азота, но утилизируют L-фенилаланин в качестве единственного источника только азота, если он дополняется этанолом в качестве единственного источника углерода. На основе этого свойства *A. baylyi* была разработана селективная среда для выделения этих бактерий из речной воды. Состав и приготовление жидкой селективной среды: в 1 л дистиллированной воды вносят (г/л) L-фенилаланин (CAS 63-91-2) 2,0; NaCI 5,0; Na_2SO_4 2,0; KH_2PO_4 1,0; K_2HPO_4 2,5; $MgSO_4$ 0,1; растворяют при нагревании, кипятят 5 мин, добавляют в теплую среду 4 мл 96-градусного этанола, проверяют pH 7,2±0,2; разливают по 40 мл в стерильные флаконы. Плотная селективная среда: содержит на 1 л дистиллированной воды те же ингредиенты и дополнительно 15,0 г агара; приготовление такое же, среду разливают в стерильные чашки Петри. Методика применения селективной питательной среды для выделения *A. baylyi* из речной воды: воду реки Невы засевают в объеме 10 мл во флакон с 40 мл жидкой селективной среды, инкубируют в аэробных условиях при 28°С 48 ч, затем пересевают бактериологической петлей обогащенный материал из флакона на поверхность плотной селективной среды такого же состава в две чашки; инкубируют посевы в аэробных условиях при 28°С 48 ч. Отбирают для последующей идентификации по 10 изолированных колоний, пересевают их на секторы питательного агара, инкубируют при 28°С 24 ч и идентифицируют изоляты по комплексу фенотипических признаков, характерных для *A. baylyi*, и/или методом MALDI-ToF MS. В данном примере из 20 выделенных изолятов 19 являлись бактериями *A. baylyi* (95% изолятов). Исследование по указанной методике еще трех проб воды из реки Невы показали результаты одинаковой узкоселективной направленности — 90–95% изолятов составляли бактерии *A. baylyi*.

Ключевые слова: *Acinetobacter baylyi, селективная синтетическая среда, выделение из речной воды, L-фенилаланин, этанол, экология бактерий.*

METHOD OF SELECTIVE ISOLATION OF *ACINETOBACTER BAYLYI* FROM RIVER WATER

Sivolodskii E.P.[a,b], Kraeva L.A.[a,b], Melnikova E.V.[a]

[a] Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation
[b] St.Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study is to increase the selectivity of isolating *Acinetobacter baylyi* from river water. For developing a selective culture medium, we used 5 strains of *A. baylyi*, 4 of which were isolated from the water of the river

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

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

Для цитирования:
Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Мельникова Е.В. Метод селективного выделения Acinetobacter baylyi из речной воды // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 191–196. doi: 10.15789/2220-7619-MOS-2112

Citation:
Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Melnikova E.V. Method of selective isolation of Acinetobacter baylyi from river water // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 191–196. doi: 10.15789/2220-7619-MOS-2112

© Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Мельникова Е.В., 2023

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MOS-2112

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

Neva, 1 — from clinical material. *A. baylyi* strains were identified by a combination of phenotypic features and/or using the mass spectrometric method (MALDI-ToF MS). In preliminary studies we found that the bacteria *A. baylyi* utilizes no L-phenylalanine as a single source of carbon and nitrogen, as well as the only source of carbon in a medium with mineral nitrogen sources, but utilizes L-phenylalanine as the only source of nitrogen only if it is supplemented with ethanol as the only source of carbon. Based on this *A. baylyi* property, a selective medium was developed for the isolation of these bacteria from river water. Composition and preparation of liquid selective medium were as follows: 1 liter of distilled water added with L-phenylalanine (CAS 63-91-2) 2.0 (g/l); NaCl 5.0; Na_2SO_4 2.0; KH_2PO_4 1.0; K_2HPO_4 2.5; $MgSO_4$ 0.1; dissolved while heating, boiled for 5 minutes, 4 ml of 96-degree ethanol was added to a warm medium, pH 7.2±0.2 assessed; 40 ml were poured into sterile vials. Dense selective medium: the same ingredients and extra 15.0 g of agar are added to 1 liter of distilled water; with similar preparation technique, the medium is poured into sterile Petri dishes. Method of application of selective nutrient medium for isolation of *A. baylyi* from river water: water from the river Neva is seeded in a volume of 10 ml into a vial with 40 ml of liquid selective medium, incubated in aerobic conditions at 28°C for 48 h, then the enriched material from the flask is placed with a bacteriological loop onto the surface of same dense selective medium in two flasks; incubated in aerobic conditions at 28°C for 48 h. 10 isolated colonies are selected for subsequent identification, they are transplanted into sectors of nutrient agar, incubated at 28°C 24 h and isolates are identified by a complex of phenotypic characteristic of *A. baylyi*, and/or by the MALDI-ToF MS method. In this case, 19 isolates from 20 were identified as *A. baylyi* (95% of isolates). A study using this technique of three more water samples from the river Neva showed the results of the same narrowly selective orientation — 90–95% of the isolates were bacteria *A. baylyi*.

Key words: *Acinetobacter baylyi, selective synthetic medium, isolation from water, L-phenylalanine, ethanol, ecology of bacteria.*

Введение

Бактерии *Acinetobacter baylyi* были выделены совместно с шестью другими новыми видами рода *Acinetobacter* в 2003 г. в Австралии из активированного ила, однако методика их выделения не сообщалась [3]. Было установлено, что штаммы *A. baylyi* обладают высокой способностью к естественной генетической трансформации. Исключительная легкость естественной трансформации сделали штаммы *A. baylyi* модельным объектом для исследования механизмов естественной трансформации, создания новых методов генной инженерии, оптимизации генома бактерий [6]. Изучение бактерий *A. baylyi*, выделенных в условиях окружающей среды, перспективно для поиска новых биоремедиаторов загрязнений природной среды и продуцентов полезных веществ, изучения экологии ацинетобактеров, в том числе в северных широтах. Бактерии *A. baylyi* редко выделяют из клинического материала [2], однако описана вспышка внутрибольничной инфекции *A. baylyi* [4] и бактериальное осложнение после операции на головном мозге [7], которые указывают на их значимость как возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Методы узкоселективного выделения бактерий *A. baylyi* из объектов внешней среды и клинического материала неизвестны. В отечественных лабораториях выделяют ацинетобактеры на этанол-аммонийной среде (ЭАС). По нашим данным среда ЭАС обеспечивает рост многих видов ацинетобактеров (*A. baumannii, A. pittii, A. nosocomialis, A. baylyi, A. johnsonii* и других), а также бактерий *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, и подавляет рост прочих бактерий. Известен метод выделения бактерий *Acinetobacter* из естественных почвенных и водных экосистем с использованием обогащения в минимальной минеральной среде с добавлением 0,1% ацетата натрия в качестве единственного источника углерода [5]. Метод обеспечивал выделение многих видов ацинетобактеров и других бактерий. Известен также метод выделения и идентификации бактерий комплекса *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii* с применением селективной синтетической питательной среды «Ацинетобактер фенилаланин агар» [2]. Селективность этой среды обеспечена трофической селекцией ацинетобактеров L-фенилаланином в качестве единственного источника углерода и азота, а также дополнительной селекцией триметопримом. На указанной среде растут преимущественно ацинетобактеры группы *A. baumannii*, однако известен случай выделения одного штамма *A. baylyi* из клинического материала [2].

Цель исследования — повышение селективности выделения бактерий *A. baylyi* из внешней среды (речной воды).

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Для разработки селективной среды использовали 4 штамма *A. baylyi* (№ 1–4), выделенных из воды реки Невы, и 1 штамм *A. baylyi* № 223, выделенный из клинического материала (мокроты) в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Для контроля питательных сред применяли штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Видовая принад-

лежность бактерий, выделяемых в ходе исследований, была подтверждена методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии.

Питательные среды и реактивы. Для культивирования бактерий использовали Колумбийский агар (НИЦФ, Санкт-Петербург). Этанол-аммонийная среда жидкая (ЭАС-1). К 100 мл дистиллированной волы добавляют фосфат натрий-аммоний 0,15 г; фосфат калия однозамещенного 0,04 г; сульфат калия 0,02 г; хлорид магния 0,02. После стерилизации при 0,5 атм в течение 15 мин добавляют 1,2 мл этилового 96-градусного спирта и разливают асептично по 10 мл в пробирки. Этанол-аммонийная среда плотная (ЭАС-2). Основной состав среды тот же, но до стерилизации добавляют 1,5 г сухого питательного агара 1,8 г и 0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего, разливают в стерильные чашки Петри.

Состав и методика приготовления синтетической селективной питательной среды для выделения A. baylyi из речной воды. Жидкая питательная среда. В 1 л дистиллированной воды вносят (г/л): L-фенилаланин (CAS 63-91-2) 2,0; NaCI 5,0; Na_2SO_4 2,0; KH_2PO_4 1,0; K_2HPO_4 2,5; $MgSO_4$ 0,1; растворяют при нагревании, кипятят в течение 5 мин, добавляют в теплую среду 4 мл 96-градусного этанола, проверяют pH 7,2±0,2, разливают по 40 мл в стерильные флаконы. *Плотная питательная среда.* Содержит на 1 л дистиллированной воды те же компоненты и дополнительно 15,0 г агара. Все компоненты растворяют при нагревании, кипятят в течение 5 мин, затем добавляют в теплую среду 4 мл этанола, проверяют pH (7,2±0,2), разливают в стерильные чашки Петри. Бактериологический контроль качества среды проводят при изготовлении среды: суточные бульонные культуры контрольных штаммов *A. baylyi* (позитивный контроль) и *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 (негативный контроль) засевают по одной петле радиальным штрихом на поверхность плотной среды в чашке Петри, инкубируют в аэробных условиях при +28°C в течение 24 ч, учитывают результат: питательная среда пригодна к использованию, если имеется рост бактерий *A. baylyi* и нет роста штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922. Срок хранения готовых сред 15 суток при температуре от 4°C до 8°C.

Методика постановки тестов идентификации A. baylyi. Отношение бактерий к окраске по Граму, морфологию и подвижность выявляли микроскопией чистых культур. Рост бактерий при +26°C, +37°C, +41°C, +44°C определяли аэробным культивированием посевов суточных бульонных культур на Колумбийском агаре с учетом через 48 ч. Гемолитическую активность бактерий исследовали на Колумбийском агаре с кровью барана при +37°C с учетом через 24 ч. Наличие каталазы устанавливали тестом с 3% раствором перекиси водорода. Цитохромоксидазу бактерий выявляли тестом с 1% водным раствором тетраметилпарафенилендиамина по появлению синей окраски бактерий в течение 20 с. Нитратредуктазу определяли микрообъемным методом в питательной среде с 0,1% KNO_3. Состав среды: пептон ферментативный 0,5 г; NaCI 0,5 г; KNO_3 0,1 г; вода дистиллированная 100 мл, стерилизация при +121°C 20 мин. По 0,1 мл среды вносят в лунки планшета, затем засевают в лунки по полной петле суточной агаровой культуры исследуемых бактерий, одну лунку не засевают (контроль среды). Посевы инкубируют при +37°C аэробно 3 ч, после чего вносят в каждую лунку реактивы на нитриты — 0,05 мл 0,2% водный раствор риванола, затем 0,05 мл 12% раствор соляной кислоты (приготовленный из концентрированной 36,5% соляной кислоты). Мгновенное появление красной окраски среды в лунке с посевом указывает на наличие нитратредуктазы бактерий, желтая окраска указывает на отсутствие нитратредуктазы; в контрольной среде без посева сохраняется желтая окраска реактива. Выявление уреазы быстрой активности осуществляли, используя среду с мочевиной из микрообъемной тест-системы «Рапид-Энтеро 200» (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). В лунки планшета вносили по 0,1 мл среды с мочевиной, затем засевали в лунки по одной петле суточной агаровой культуры исследуемых бактерий (одна лунка без посева — контроль среды). Посевы инкубировали при +37°C в течение 3 ч. Появление красной окраски среды в лунке с посевом при сохранении исходной окраски в контрольной лунке указывает на наличие уреазы быстрой активности.

Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода осуществляли на минимальной минеральной среде. Состав среды (г/л): NH_4CI 5,0; NH_4NO_3 1,0; Na_2SO_4 2,0; K_2HPO_4 3,0; KH_2PO_4 1,0; $MgSO_4$ 0,1; агар 15,0; 1,6%-ный водный раствор бромтимолового синего 4 мл, дистиллированная вода 1 л; pH 7,2; стерилизация при +121°C 20 мин. Каждый субстрат вносили по 0,1 г в отдельную колбу с 50 мл стерильной горячей среды, устанавливали pH 7,2; в одну колбу субстрат не вносили (контроль среды), разливали в чашки Петри. Использовали субстраты: D-глюкоза, L-фенилаланин, L-арабиноза, путресцин (Merck, Германия). Суточные агаровые культуры бактерий по полной петле суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85% раствора NaCI в лун-

Таблица 1. L-фенилаланин как единственный источник азота для роста бактерий *Acinetobacter baylyi* при участии этанола как единственного источника углерода

Table 1. L-phenylalanine as the sole nitrogen source for growth of bacteria *Acinetobacter baylyi* supplemented with ethanol as the sole carbon source

Исследуемые штаммы бактерий Investigated bacterial strains	**Минеральная солевая основа среды без азота и углерода*** Nitrogen/carbon-free mineral salt based medium*	**L-фенилаланин (2 г/л), минеральная солевая основа среды без азота и углерода** Nitrogen/carbon-free mineral L-phenylalanine (2 g/l), mineral salt based medium	**Этанол (4 мл/л), минеральная солевая основа среды без азота и углерода** Nitrogen/carbon-free mineral ethanol (4 ml/l) mineral salt based medium	**L-фенилаланин (2 г/л), этанол (4 мл/л), минеральная солевая основа среды без азота и углерода** Nitrogen/carbon-free mineral L-phenylalanine (2 g/l) ethanol (4 ml/l) mineral salt based medium
***A. baylyi* 1**	–**	–	–	+***
***A. baylyi* 2**	–	–	–	+
***A. baylyi* 3**	–	–	–	+
***A. baylyi* 4**	–	–	–	+
***A. baylyi* 223**	–	–	–	+

Примечание. * — минеральная солевая основа плотной среды (NaCl, Na_2SO_4, $MgSO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4); ** — отсутствие роста бактерий; *** — наличие роста бактерий.

Note. * — mineral salt base of dense medium (NaCl, Na_2SO_4, $MgSO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4); ** — no of bacterial growth; *** — no of bacterial growth.

ках полимерного планшета. Засевали исследуемые культуры по полной петле взвеси бактерий из лунки радиальным штрихом на сектор чашки с субстратом и контролем. Посевы выращивали при +37°С в течение 3 суток, просматривая ежедневно. Положительным результатом утилизации субстрата считали наличие четко выраженного газона бактерий по следу посева при отсутствии роста бактерий на контрольной среде без субстрата.

Идентификация видов бактерий методом MALDI-ToF MS. Использовали масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Германия) в соответствии с инструкцией по применению.

Результаты

Известно, что бактерии *A. baylyi* не используют L-фенилаланин для роста в качестве единственного источника углерода на минимальных солевых средах с минеральными источниками азота [3, 5]. Нами в эксперименте показано, что они также не используют L-фенилаланин в качестве единственного источника углерода и азота на минимальной солевой среде (табл. 1). Впервые нами установлено экспериментально, что бактерии *A. baylyi* могут утилизировать для роста L-фенилаланин в качестве единственного источника только азота при участии этанола как единственного источника углерода (табл. 1). На основе

Таблица 2. Узкоселективный эффект выделения из воды реки Невы бактерий *Acinetobacter baylyi* предлагаемым методом

Table 2. Narrowly selective effect of *Acinetobacter baylyi* isolation from the Neva River water by the method proposed

Виды бактерий изолятов, выделенных из одной пробы воды Species of bacterial isolates, isolated from a single water sample	**Число изолятов видов из 20 изученных изолятов одной пробы воды, выделенных на этанол-аммиачной среде** The number of isolates of species from 20 studied isolates of a single water sample, isolated on ethanol-ammonia medium	**Число изолятов видов из 20 изученных изолятов одной пробы воды, выделенных предлагаемым методом** The number of isolates of species from 20 studied isolates of a single water sample, isolated by the proposed method
A. baylyi	0	19
A. johnsoni	8	0
A. radioresistens	1	0
A. haemolyticus	2	0
A. towntri	1	0
A. tandoi	3	0
Бактерии прочих родов (*Pseudomonas, Klebsiella* и другие) Bacteria of other genera (*Pseudomonas, Klebsiella* and others)	5	1

этого свойства *A. baylyi* была создана селективная среда для выделения бактерий *A. baylyi* из речной воды, состав и приготовление которой изложены в разделе «Материалы и методы».

Методика применения селективной синтетической питательной среды для выделения бактерий A. baylyi из речной воды. Исследуемый материал — воду реки Невы — засевают в объеме 10 мл во флакон с 40 мл жидкой питательной среды предлагаемого метода, инкубируют в аэробных условиях при +28°С в течение 48 ч, затем пересевают бактериологической петлей обогащенный материал из флакона на поверхность плотной питательной среды такого же состава в двух чашках Петри. Инкубируют посевы в аэробных условиях при +28°С в течение 48 ч, отбирают для последующей видовой идентификации по 10 изолированных колоний, характерных для ацинетобактеров, пересевают их на секторы питательного агара, инкубируют в аэробных условиях при +28°С в течение 24 ч и идентифицируют видовую принадлежность изолятов по комплексу фенотипических признаков и/или методом MALDI-ToF MS. Бактерии *A. baylyi* — грамотрицательные коккобактерии, неподвижные; колонии диаметром 2 мм, выпуклые, светло-серые, мутные; оксидазоотрицательные, каталазоположительные; не ферментируют, но окисляют глюкозу; не имеют нитратредуктазу; имеют быструю уреазу; утилизируют в качестве единственного источника углерода глюкозу; не утилизируют L-фенилаланин, L-арабинозу, путресцин.

Сочетание L-фенилаланина и этанола в питательной среде неожиданно выявило необычный узкоселективный эффект обильного выделения бактерий *A. baylyi* из речной воды — 95% всех изолятов бактерий (19 из 20 изученных колоний), выделенных из одной пробы воды Невы, являлись видом *A. baylyi* (табл. 2).

При сравнительном изучении этой же пробы воды с использованием этанол-аммонийной среды не было выявлено бактерий *A. baylyi*, однако были обнаружены бактерии прочих видов ацинетобактеров и изоляты других родов бактерий (табл. 2). При повторных исследованиях трех проб воды реки Невы были получены результаты одинаковой направленности — предлагаемым методом выделялись преимущественно бактерии *A. baylyi* (90–95% изолятов).

Обсуждение

Механизм выявленного узкоселективного выделения бактерий *A. baylyi* из речной воды состоит в том, что известный источник углерода этанол, имеющий широкий спектр трофического селективного действия для большинства видов ацинетобактеров, при дополнении его L-фенилаланином, который является для *A. baylyi* источником только азота, создают более специфические селективные условия, чем универсальные минеральные источники азота (NH_4Cl, NH_4NO_3) или аминокислоты, как источники углерода и азота. При этом свойство *A. baylyi* использовать L-фенилаланин как источник только азота непосредственно определяет достижение поставленной цели повышения селективности выделения бактерий *A. baylyi* из речной воды. Комплекс минеральных солей среды обеспечивает метаболизм бактерий и направляет его на усвоение этанола и L-фенилаланина. Температура +28°С является оптимальной для культивирования *A. baylyi*. Этап предварительного обогащения речной воды в жидкой питательной среде и время инкубации 48 ч обусловлены разнообразием и малой концентрацией бактерий в воде. Разработанный метод обеспечивает выделение из речной воды неограниченного количества штаммов бактерий *A. baylyi*, что будет способствовать поиску новых биоремедиаторов загрязнений природной среды, изучению экологии ацинетобактеров и эпидемиологии ацинетобактерных инфекций.

Заключение

Разработан метод селективного выделения бактерий *A. baylyi* из речной воды, позволяющий избирательно выделять из проб воды преимущественно бактерии *A. baylyi*. На способ получен патент Российской Федерации на изобретение № 2769434 [1].

Благодарности

Авторы благодарят старшего лаборанта кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Т.Б. Белогурову за помощь в отборе проб воды из реки Невы.

Список литературы/References

1. Патент № 2769434 Российская Федерация. МПК C12N 1/20 (2006.01), C12Q 1/04 (2006.01), C12R 1/01 (2006). Способ выделения бактерий вида Acinetobacter baylyi из речной воды; № 2021130073, заявлено 2021.10.14, опубликовано 2022.03.31 / Сиволодский Е.П. Патентообладатель: Сиволодский Евгений Петрович. 6 с. [Patent No 2769434 Russian Federation, Int.Cl. C12N 1/20 (2006.01), C12Q 1/04 (2006.01), C12R 1/01 (2006/01). Method for isolation of Acinetobacter baylyi from river water; № 2021130073, application 2021.10.14; date of publication 2022.03.31 / Sivolodskij E.P. Proprietors Sivolodskij Evgenij Petrovich. 6 p. *(In Russ.)*]

2. Сиволодский Е.П., Горелова Г.В., Богословская С.П., Зуева Е.В. Селективная синтетическая питательная среда «Ацинетобактер фенилаланин агар» для выделения и идентификации бактерий комплекса Acinetobacter calcoaceticus –Acinetobacter baumannii // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 5. С. 591–596. [Sivolodskii E.P., Gorelova G.V., Bogoslovskaja S.P., Zueva E.V. Selective syntetic growth medium «Acinetobacter phenylalanine agar» for isolation and identification of Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii complex species. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 591–596. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2020-7619-ASS-1177*
3. Carr E.L., Kampfer P., Patel B.K.C., Gurtler V., Seviour R.J. Seven novel spesies of Acinetobacter isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2003, vol. 53, no. 4, pp. 953–963. doi: 10.1099/ijs.0.02486-0*
4. Chen T.L., Siu L.K., Lee Y.T., Chen C.H., Huang L.Y., Wu R.C., Cho W.L., Fung C.P. Acinetobacter baylyi as a pathogen for opportunistic infection. *J. Clin. Microbiol., 2008, vol. 46, no. 9, pp. 2938–2944. doi: 10.1128/JCM.00232-08*
5. Krizova L., Maixnerova M., Sedo O., Nemec A. Acinetobacter albensi sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2015, vol. 65, no. 11, pp. 3905–3915. doi: 10.1099/ijs.0.00051*
6. Suarez G.A., Dugan K.R., Renda B.A., Leonard S.P., Gangavarapu L.S., Barrick J.E. Rapid and assured genetic engineering methods applid to Acinetobacter baylyi ADPI genome streamlining. *Nucleic Acids Res., 2020, vol. 48, no.8, pp. 4505–4600. doi: 10.1093/nar/gkaa204*
7. Zhou Z., Du X., Wang L., Yang Q., Fu Y., Yu Y. Clinical carbapenem-resistant Acinetobacter baylyi strain coharboring blaSIM-1 and blaOXA-23 from China. *Antimicrob. Agents Chemother., 2011, vol. 55, no. 11, pp. 5347–5349. doi: 10.1128/AAC.00425-11*

Авторы:

Сиволодский Е.П., д.м.н., профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Краева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

Мельникова Е.В., врач-бактериолог лаборатории бактериологии Центральной клинико-диагностической лаборатории ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sivolodskii E.P., DSc (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Biological Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kraeva L.A., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

Melnikova E.V., Bacteriologist, Laboratory of Bacteriology of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.01.2023
Принята к печати 12.02.2023

Received 04.01.2023
Accepted 12.02.2023

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства **(http://iimmun.ru)** в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appletion & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli, Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисуночные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
   1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
      - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
      - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
      - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
      - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
      - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
      - полное название статьи, направляемой в редакцию;
      - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
      - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
      - дата отправления работы.
   2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
   - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
   - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
   - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
   - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
   - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
   - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	**Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные**	**Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке**	**Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI**
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. **Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк**	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы **www.e-library.ru**. DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала **(http://iimmun.ru)** в рубрике **«Рецензирование»** раздела **«О журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал
«Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
в сети Internet на сайте www.arpk.org.
Подписной индекс 41392.
Подписка на электронную версию журнала
на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авадэний И. ... 91
Атажахова М.Г. ... 9
Афридонова З.Э. ... 55
Бадлеева М.В. ... 91
Бадтиев А.К. ... 161
Батагова Ф.Э. ... 161
Белопольская О.Б. ... 91
Борисова О.В. ... 67
Брюхачева Е.О. ... 156
Воробьева О.В. ... 183
Вторушина В.В. ... 46
Вязовая А.А. ... 91
Герасимова А.А. ... 91
Гималдинова Н.Е. ... 183
Драгомерецкая А.Г. ... 100
Евсеенко В.А. ... 37
Ермолаева Ю.А. ... 174
Жданова С.Н. ... 91
Журавлев В.Ю. ... 91
Зайковская А.В. ... 37
Закиров Р.Ш. ... 55
Захарова Ю.В. ... 156
Зубков В.В. ... 46
Инвияева Е.В. ... 46
Каира А.Н. ... 67
Косолапова Ю.А. ... 46
Костюкова И.В. ... 91
Краева Л.А. ... 191
Кречетова Л.В. ... 46
Кубарь О.И. ... 29
Кудряшова А.М. ... 67
Макиева М.И. ... 46
Мануйлов В.А. ... 67
Матушкина В.А. ... 9
Матущенко Е.В. ... 100
Машарский А.Э. ... 91
Мельникова Е.В. ... 191
Микиртичан Г.Л. ... 29
Митропанова М.Н. ... 9
Мокроусов И.В. ... 91
Мударисова Р.С. ... 91
Мурзина А.А. ... 67
Найзабаева Д.А. ... 91
Нестерова И.В. ... 9
Огарков О.Б. ... 91
Олькин С.Е. ... 37
Отдушкина Л.Ю. ... 156
Пасечник О.А. ... 91
Пономарева Д.А. ... 174
Проценко А.В. ... 174
Пухаева Е.Г. ... 161
Пьянзова Т.В. ... 156
Пьянков О.В. ... 37
Романова Л.П. ... 183
Рудаков Н.В. ... 100
Руруа Ф.К. ... 161
Самойленко И.Е. ... 100
Самойлов К.В. ... 174
Санников А.В. ... 100
Семикина Е.Л. ... 55
Сиволодский Е.П. ... 191
Скиба Ю.А. ... 91
Скупневский С.В. ... 161
Соловьева Н.С. ... 91
Тетерин Ю.В. ... 9
Топтыгина А.П. ... 55
Троценко О.Е. ... 100
Фариниева Ж.Г. ... 161
Худякова А.А. ... 174
Чудилова Г.А. ... 9
Шпынов С.Н. ... 100
Штрек С.В. ... 100
Щучинова Л.Д. ... 100
Abovyan R.A. ... 75
Al-Hakeim H.K. ... 147
Al-Rawi K.F. ... 147
Amalia K. ... 133
Antipov V.A. ... 167
Arbuzova T.V. ... 75
Bakunts N.G. ... 75
Boundenga L. ... 119
Chupakhin O.N. ... 107
Dang T.H. ... 127
Drozd I.V. ... 75
Egorova S.A. ... 75
Ereshchenko A.A. ... 167
Fedorchenko T.G. ... 107
Ferrara F. ... 171
Gubanova A.V. ... 75
Huwae T.E.C.J. ... 133
Ivanov V.A. ... 75
Keshishyan A.S. ... 75
Kondratenko O.V. ... 167
Le N.D. ... 127
Le T.H. ... 127
Lipunova G.N. ... 107
Lyamin A.V. ... 167
Mahmood L.A. ... 147
Melik-Andreasyan G.G. ... 75
Milichkina A.M. ... 75
Mohammed M.A. ... 147
Nguyen B.N. ... 127
Nguyen T.B. ... 127
Nguyen T.N.T. ... 127
Obaid H.M. ... 119
Osmani F. ... 141
Palozyan G.H. ... 75
Petrova O.A. ... 75
Popova A.Yu. ... 75
Putera M.A. ... 133
Ramsay E.S. ... 75
Ratridewi I. ... 133
Razumovskaya A.P. ... 75
Sale S.S. ... 119
Saleh R.O. ... 147
Smirnov V.S. ... 75
Sulistijono E. ... 133
Totolian A.A. ... 75
Truong T.M.H. ... 127
Tungusov V.N. ... 107
Vanyan A.V. ... 75
Vitiello A. ... 171
Volobueva A.S. ... 107
Zarubaev V.V. ... 107
Zhimbayeva O.B. ... 75

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

авидность ... 67
адъювант Фрейнда ... 162
альвеолит ... 184
антитела ... 38, 55
аутоиммунный ревматоидный артрит ... 162
беременность ... 47
бифидобактерии ... 156
вакцинация ... 55
вера и доверие ... 29
вирулентность ... 92
выделение из речной воды ... 191
генотип Beijing ... 92
гибридный иммунитет ... 55
гипериммунные сыворотки ... 38
гипоталамический синдром ... 175
дети ... 175
диалог с обществом ... 29
дисбиоз кишечника ... 156
доверие и недоверие ... 29
иммунопатологический процесс ... 162
иммунотромбоз ... 10
ИФА ... 67
клеточный иммунитет ... 55
кросс-реактивность ... 38
купризон ... 162
лактобактерии ... 156
матурация ... 67
механизм аутоиммунной патологии ... 162
микробиота ... 156
микрофлора кишечника у детей ... 156
митохондриальная дисфункция ... 162
множественная лекарственная устойчивость ... 92
морбидное ожирение ... 175
нейтрофильные гранулоциты ... 10
нейтрофильные экстацеллюлярные сети ... 10
нетопатии ... 10
нефрогенный отек легких ... 184
новая коронавирусная инфекция ... 175
новорожденные ... 47
нравственная позиция ... 29
общественный ответ ... 29
персональный выбор ... 29
пневмонит ... 184
пневмония ... 175
поликистоз ... 184
полногеномное секвенирование ... 92
почки ... 184
прорывной иммунитет ... 55
противотуберкулезное лечение ... 156
профессиональный долг ... 29
реакция нейтрализации ... 38
Республика Алтай ... 100
селективная синтетическая среда ... 191
социальная ответственность ... 29
спектр недоверия ... 29
субпопуляции лимфоцитов ... 47
сыворотки крови человека ... 67
туберкулез у детей ... 156
уроки пандемии ... 29
уязвимость вакцинации ... 29
Хабаровский край ... 100
экология бактерий ... 191
этанол ... 191
Acinetobacter baylyi ... 191
ACPA ... 147
activity ... 119
antioxidants ... 107
antiviral activity ... 107
ARDS ... 10
Candida score ... 133
Candidatus *Rickettsia tarasevichiae* ... 100
clinical symptoms ... 127
COVID-19 ... 10, 38, 47, 55, 67, 75, 171, 175, 184
Coxsackievirus ... 107
cystic fibrosis ... 167
decision tree ... 141
diagnostic test ... 133
Entamoeba histolytica ... 119
enteroviral infection ... 107
Enteroviruses ... 107
Giardia lamblia ... 119
hepatitis B virus ... 141
herd immunity ... 75
heterocyclic compound ... 119
IgG-антитела ... 67
inflammation ... 147
laboratory signs ... 127
late onset sepsis ... 133
leucoverdazyles ... 107
lower airways ... 167
L-фенилаланин ... 191
machine learning ... 141
MALDI-ToF mass spectrometry ... 167
mHLA-DR ... 127
monocyte count ... 133
Mycobacterium tuberculosis ... 92
nasal lavage ... 167
nCD64 ... 127
neonatal sepsis ... 127
NETs ... 10
neural network analysis ... 147
NK-клетки ... 47
osteopontin ... 147
pandemic ... 171
paranasal sinuses ... 167
pharmaceutical ... 119
population ... 75
premature infant ... 133
renin-angiotensin system ... 171
Republic of Armenia ... 75
rheumatoid arthritis ... 147
Rickettsia heilongjiangensis ... 100
Rickettsia raoultii ... 100
Rickettsia sibirica ... 100
ROC curve ... 141
SARS-CoV-2 ... 10, 38, 47, 55, 75, 171, 175
sepsis index ... 127
sputum ... 167
stromelysin-1 ... 147
synthetized ... 119
systemic candidosis ... 133
vaccination ... 75
verdazyles ... 107
vitamin D ... 141
vitamin D deficiency ... 141
volunteers ... 75

Иллюстрации к статье «Особенности развития аутоиммунной патологии в условиях митохондриальной дисфункции у крыс» (авторы: С.В. Скупневский, Е.Г. Пухаева, А.К. Бадтиев, Ф.К. Руруа, Ф.Э. Батагова, Ж.Г. Фарниева) (с. 161–166)

Illustrations for the article "The features of developing rat autoimmune pathology with mitochondrial dysfunction" (authors: Skupnevskii S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Zh.G.) (pp. 161–166)

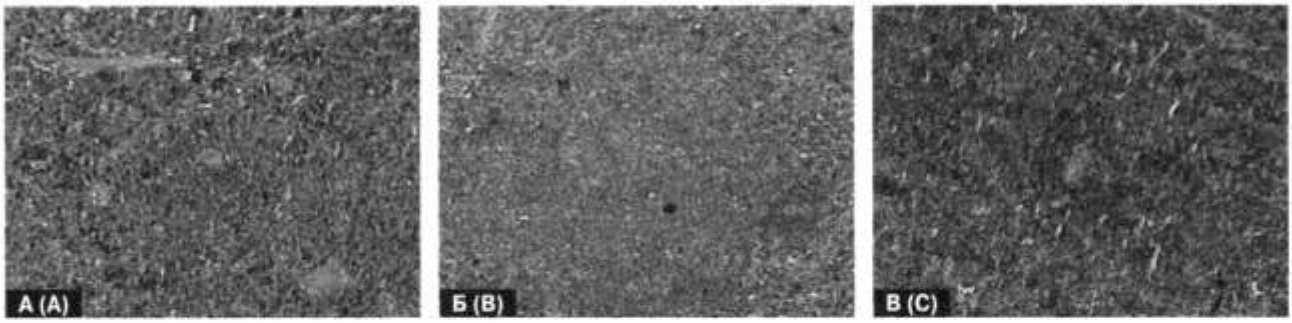


Рисунок. Микрофотографии селезенки крыс: лимфоидные узелки и участки красной пульпы (увеличение 10×20): А) негативный контроль; Б) позитивный контроль; В) опыт

Figure. Micrographs of the rat spleen: lymphoid nodules and areas of red pulp (magnification 10×20): A) negative control; B) positive control; C) experiment

Иллюстрация к статье «Опыт микробиологического мониторинга жидкости назального лаважа для раннего выявления и профилактики бактериальных осложнений легких у пациента с муковисцидозом» (авторы: О.В. Кондратенко, А.В. Лямин, А.А. Ерещенко, В.А. Антипов) (с. 167–170)

Illustration for the article "Microbiological monitoring of nasal lavage fluid as a method for early detection and prevention of bacterial lung complications in a patient with cystic fibrosis" (authors: Kondratenko O.V., Lyamin A.V., Ereshchenko A.A., Antipov V.A.) (pp. 167–170)

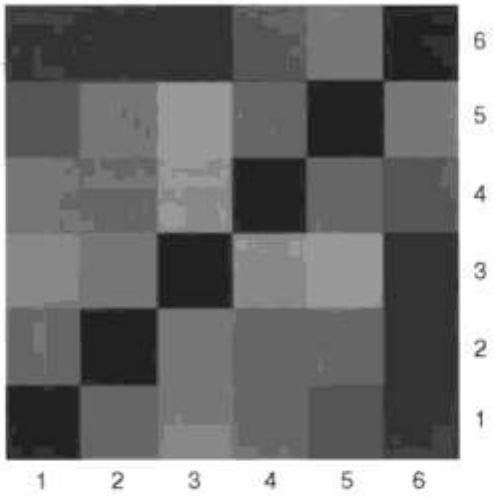


Figure. Cluster dendrogram constructed by using 5 strains isolated from patient R. (1–5) and a typical strain of *P. aeruginosa* (6)

Note. Mass spectrums of bacterial strains are located along the Y-axis (vertical line) from bottom to top of the dendrogram, along the X-axis (horizontal lines) from left to right of the dendrogram. The color of the cell reflects the degree of affinity of the corresponding strain pair. The range of cell colors corresponds to the thermal imaging scale from dark blue (with absolute difference in strains) to dark red (with complete coincidence).

Иллюстрации к статье «Клинический случай инфицирования SARS-CoV-2, осложненного нефрогенным отеком легких и COVID-ассоциированным пневмонитом, альвеолитом» (авторы: О.В. Воробьева, Н.Е. Гималдинова, Л.П. Романова) (с. 183–190)

Illustrations for the article "A clinical case of SARS-CoV-2 infection complicated by nephrogenic pulmonary edema and COVID-associated pneumonitis, alveolitis" (authors: Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.) (pp. 183–190)

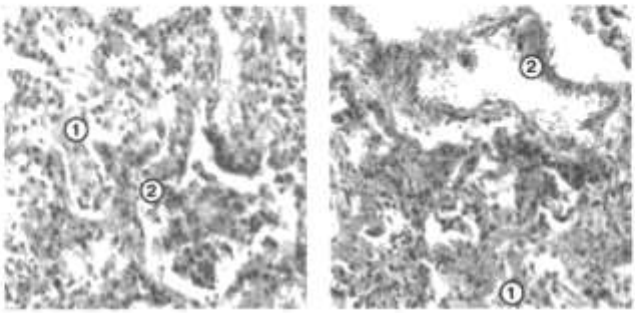


Рисунок 1. Микроскопическая картина вирусной пневмонии: просвет альвеол заполнен серозно-фибринозным экссудатом, слущенными альвеолоцитами (1), часть альвеол заполнена эритроцитами (2). Межальвеолярные перегородки утолщены за счет отека и кровоизлияний. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×900

Figure 1. Microscopic picture of viral pneumonia: the lumen of the alveoli is filled with serous-fibrinous exudate, desquamated alveolocytes (1), some of the alveoli are filled with erythrocytes (2). The interalveolar septa are thickened due to edema and hemorrhages. Staining with hematoxylin and eosin, magnification ×900

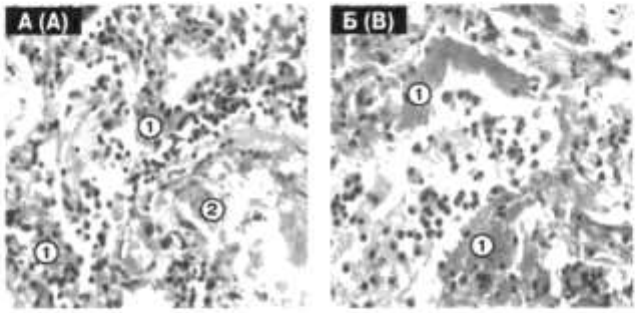


Рисунок 2. Микроскопическая картина вирусной пневмонии. А. Межальвеолярные перегородки утолщены за счет кровоизлияний (1), просветы альвеол заполнены эритроцитами (2). Б. На стенках альвеол наложения гомогенных розовых масс в виде «полулуний» по типу гиалиновых мембран (1). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×900

Figure 2. Microscopic picture of viral pneumonia. A. The interalveolar septa are thickened due to hemorrhages (1), the alveolar lumens are filled with erythrocytes (2). B. On the walls of the alveoli there are homogeneous pink masses in the form of "crescents" similar to hyaline membranes (1). Staining with hematoxylin and eosin, magnification ×900

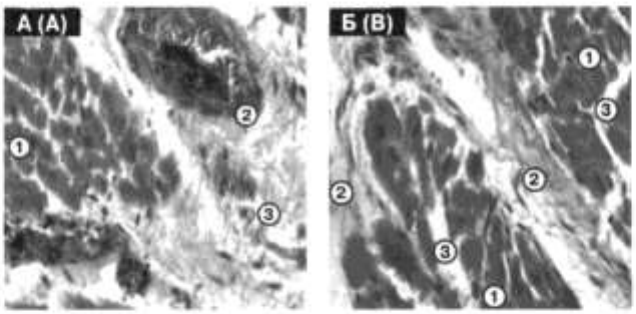


Рисунок 3. Микроскопическая картина изменений в сердце. А. Гипертрофированные кардиомиоциты (1), кардиосклероз, утолщение и ангиосклероз (2), признаки интерстициального отека (3). Б. Гипертрофия и фрагментация кардиомиоцитов (1), участки кардиосклероза (2), признаки интерстициального отека (3). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×900

Figure 3. Microscopic picture of changes in the heart. A. Hypertrophied cardiomyocytes (1), cardiosclerosis, thickening and angiosclerosis (2), signs of interstitial edema (3). B. Hypertrophy and fragmentation of cardiomyocytes (1), areas of cardiosclerosis (2), signs of interstitial edema (3). Staining with hematoxylin and eosin, magnification ×900

Иллюстрации к статье «Клинический случай инфицирования SARS-CoV-2, осложненного нефрогенным отеком легких и COVID-ассоциированным пневмонитом, альвеолитом» (авторы: О.В. Воробьева, Н.Е. Гималдинова, Л.П. Романова) (с. 183–190)

Illustrations for the article "A clinical case of SARS-CoV-2 infection complicated by nephrogenic pulmonary edema and COVID-associated pneumonitis, alveolitis" (authors: Vorobeva O.V., Gimaldinova N.E., Romanova L.P.) (pp. 183–190)

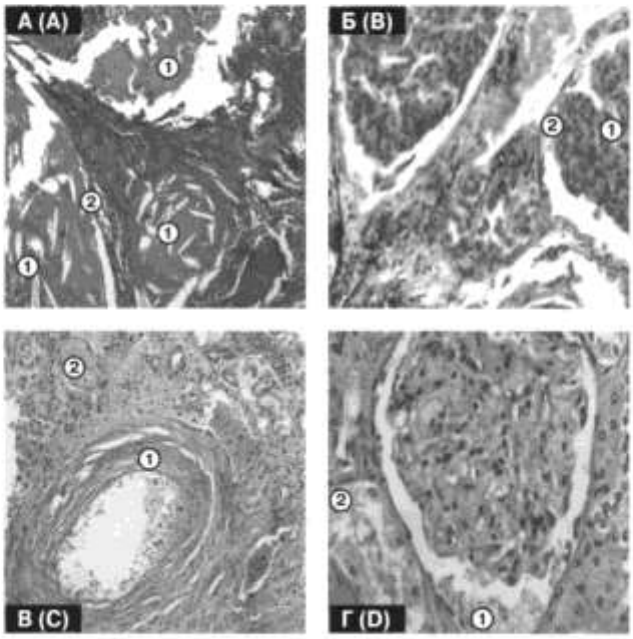


Рисунок 4. Микроскопическая картина изменений в почках. А. В паренхиме почки — крупные кисты (1), выстланные низким кубическим эпителием (2). Б. Субатрофические изменения сохраненных клубочков (1), белковые массы в просвете капсулы клубочка (2). В. Склероз и утолщение стенки артериолы (1), склероз клубочка (2). Г. Белковые массы в просвете капсулы (1), эпителий канальца с кариолизисом (2). Окраска гематоксилином и эозином, А, Б, Г — увеличение ×900, В – увеличение ×400

Figure 4. Microscopic picture of changes in the kidneys. A. In the parenchyma of the kidney — large cysts (1), lined up with low cuboidal epithelium (2). B. Subatrophic changes in preserved glomeruli (1), protein masses in the lumen of the glomerular capsule (2). C. Sclerosis and thickening of arteriolar wall (1), sclerosis of the glomerulus (2). D. Protein masses in the lumen of the capsule (1), tubule epithelium with karyolysis (2). Staining with hematoxylin and eosin, A, B, D — magnification ×900, C — magnification ×400

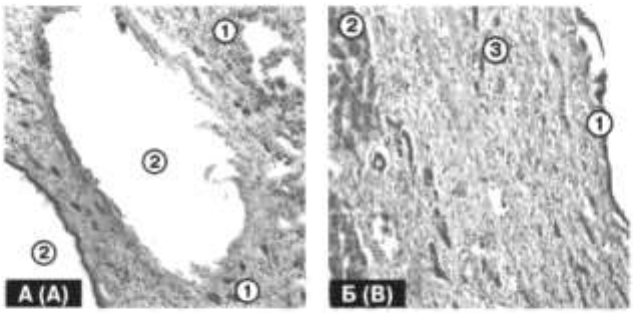


Рисунок 5. Микроскопическая картина изменений в печени. А. Дискомплектация печеночных балок (1) с наличием расширенных полостей по типу кист, местами окруженных зоной склероза (2). Б. Стенка кисты, выстланная однослойным эпителием (1), нарушение балочного строения (2), лимфомакрофагальная инфильтрация (3). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×400

Figure 5. Microscopic picture of changes in the liver. A. Discompletion of the hepatic beams (1) with the presence of enlarged cavities like cysts, sometimes surrounded by a sclerosis zone (2). B. Cyst wall lined up with a single-layered epithelium (1), altered beam structure (2), lympho-macrophage infiltration (3). Staining with hematoxylin and eosin, magnification ×400