Том 13, № 3. С. 401–600
2023
ISSN 2220-7619 (print)
ISSN 2313-7398 (online)

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Данный выпуск реализован при финансовой поддержке Правительства Санкт-Петербурга

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

май–июнь
2023, том 13 **№ 3**

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

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 26.06.2023 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1167

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)

May–June

2023, volume 13 **No. 3**

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

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.
Тел.: (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 26.06.2023. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Бурова Л.А., Суворов А.Н., Пигаревский П.В., Тотолян Артем А.
АУТОИММУННЫЙ СТРЕПТОКОККОВЫЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ: ПРОБЛЕМА НЕФРИТОГЕННОСТИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* 409

Оригинальные статьи

Хромова Е.А., Ахматова Н.К., Костинов М.П., Сходова С.А., Столпникова В.Н., Власенко А.Е., Полищук В.Б., Шмитько А.Д.
ВЛИЯНИЕ ИММУНОАДЪЮВАНТНОЙ И БЕЗАДЪЮВАНТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO* 430

Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Авдиенко В.Г., Бочарова И.В., Еремеев В.В.
ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ 439

Савченко А.А., Мартынова Г.П., Иккес Л.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д.
ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ GM-CSF *IN VITRO* 446

Фунтиков А.А., Литвинова Н.А., Зуев Е.В., Кулемзин С.В., Шукуров Р.Р.
ОЦЕНКА УРОВНЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ, ИНДУЦИРОВАННЫХ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19: РАЗРАБОТКА АНАЛИЗА БЫСТРОЙ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИТЕЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ НА ОСНОВЕ ПСЕВДОВИРУСА 457

Казаков С.П., Решетняк Д.В., Давыдова Н.В., Ефимушкина О.А., Путков С.Б.
АНАЛИЗ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ «СПУТНИК V» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ 469

Попкова М.И., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Соболева Е.А., Назарова Л.В.
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР: ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ 481

Рычкова Л.В., Даренская М.А., Петрова А.Г., Семенова Н.В., Москалева Е.В., Колесников С.И., Ваняркина А.С., Колесникова Л.И.
ВЗАИМОСВЯЗЬ ОТДЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА С АКТИВНОСТЬЮ СИСТЕМЫ «ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЯ — АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА» У НОВОРОЖДЕННЫХ С COVID-19 497

Смирнова О.В., Гончарова Н.С.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ НОСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО РИНИТА 506

Отдушкина Л.Ю., Захарова Ю.В., Холодов А.А., Пьянзова Т.В.
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ 517

Кожухова Е.А., Андреева Н.В., Дмитриева М.И., Николаенко С.Л.
ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУЧАЕВ ОСТРОЙ ДИАРЕИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ, В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ КОТОРЫХ ВЫЯВЛЕН *CAMPYLOBACTER* spp. 526

Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Таран Т.В., Платонов А.Е.
КЛЕЩЕВЫЕ ТРАНСМИССИВНЫЕ ИНФЕКЦИИ НА ЮГЕ РОССИИ: СОВРЕМЕННАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ, НОВЫЙ ПОДХОД К ПОСТРОЕНИЮ ПРОГНОЗНЫХ И ОБЪЯСНЯЮЩИХ МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ (НА ПРИМЕРЕ АСТРАХАНСКОЙ РИККЕТСИОЗНОЙ И КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДОК) 535

Резаи Э., Джамали Э., Форузанфар З., Атаи Ф., Бехешти Ш., Джулаи Х.
ОЦЕНКА УРОВНЯ ПРОТЕИНОВ S И C И ЕГО СВЯЗЬ С ФАКТОРАМИ, СВЯЗАННЫМИ СО ЗДОРОВЬЕМ, У ЛЮДЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ: ПОПЕРЕЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 549

Шафихани М., Аболгасеми С., Асгарпур М., Заре З., Негабан Х., Акбари Р., Никупур Х., Розбех Дж., Олиайе Ф., Яхьяпур Ю., Джерайли З., Барари М., Эбрахимпур С., Базиборун М.
ПОСТКОВИДНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ У РЕЦИПИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКИ 559

Барило А.А., Смирнова С.В.
ГРИБКОВАЯ АЛЛЕРГИЯ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ РОЗАЦЕА 567

Краткие сообщения

Конышев И.В., Дудина Л.Г., Морозова Н.А., Бывалов А.А.
АДГЕЗИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ К КЛЕТКАМ ИЕРСИНИЙ, ОЦЕНЕННАЯ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ЛОВУШКИ 573

Горбунов С.Г., Мазанкова Л.Н., Оськин А.Н.
ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ TLR3 И TLR7 ПРИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА 579

В помощь практическому врачу

Каликян З.Г.
РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 586

Методы

Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Мельникова Е.В., Горелова Г.В.
МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* bv. *TRYPTOPHANDESTRUENS* И ЕГО СУББИОВАРОВ А И В 591

Правила для авторов 597

Авторский указатель 600

Предметный указатель 600

CONTENTS

Reviews

Burova L.A., Suvorov A.N., Pigarevsky P.V., Totolian Artem A.
AUTOIMMUNE STREPTOCOCCAL GLOMERULONEPHRITIS: THE *STREPTOCOCCUS PYOGENES*-RELATED NEPHRITOGENICITY 409

Original articles

Khromova E.A., Akhmatova N.K., Kostinov M.P., Skhodova S.A., Stolpnikova V.N., Vlasenko A.E., Polishchuk V.B., Shmitko A.D.
THE IMPACT OF ADJUVANTED AND NON-ADJUVANTED INFLUENZA VACCINES ON *IN VITRO* LYMPHOCYTE IMMUNOPHENOTYPE 430

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yeremeev V.V.
THE EFFECT OF SAPOSIN D ON THE ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNE RESPONSE IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION 439

Savchenko A.A., Martynova G.P., Ikkes L.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Belenjuk V.D.
CHANGES IN *IN VITRO* GM-CSF-EXPOSURED MONOCYTE SUBSET COMPOSITION AND PHAGOCYTIC ACTIVITY IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS 446

Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.
EVALUATION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODY LEVEL AFTER NOVEL CORONAVIRUS INFECTION COVID-19: DEVELOPMENT OF AN INSTANT ASSAY ASSESSING PROTECTIVE ANTIBODIES USING A PSEUDOVIRUS-BASED REACTION 457

Kazakov S.P., Reshetnyak D.V., Davydova N.V., Efimushkina O.A., Putkov S.B.
VARIOUS REAGENT KITS FOR COMPARATIVELY ANALYZED EFFECTIVENESS OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE AFTER VACCINATION "SPUTNIK V" 469

Popkova M.I., Utkin O.V., Filatova E.N., Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Soboleva E.A., Nazarova L.V.
MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF THE EPSTEIN–BARR VIRUS: A RELATIONSHIP WITH THE CLINICAL FEATURES OF PEDIATRIC INFECTIOUS MONONUCLEOSIS 481

Rychkova L.V., Darenskaya M.A., Petrova A.G., Semenova N.V., Moskaleva E.V., Kolesnikov S.I., Vanyarkina A.S., Kolesnikova L.I.
A RELATION BETWEEN SPECIFIC IMMUNE STATUS INDICATORS AND ACTIVITY OF "LIPID PEROXIDATION – ANTIOXIDANT DEFENSE" SYSTEM IN COVID-19 NEONATES 497

Smirnova O.V., Goncharova N.S.
COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF NASAL MUCOSA MICROFLORA IN VARIOUS FORMS OF CHRONIC RHINITIS 506

Otdushkina L.Yu., Zakharova Yu.V., Kholodov A.A., Pyanzova T.V.
MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF PROBIOTIC THERAPY IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS 517

Kozhukhova E.A., Andreeva N.V., Dmitrieva M.I., Nikolaenko S.L.
CHARACTERISTICS OF ACUTE DIARRHEA IN ADULT CASES WITH *CAMPYLOBACTER* spp. POSITIVE FECAL SAMPLES 526

Prislegina D.A., Maletskaya O.V., Dubyanskiy V.M., Taran T.V., Platonov A.E.
TICK-BORNE INFECTIONS IN THE SOUTH OF RUSSIA: MODERN EPIDEMIOLOGICAL SITUATION, NEW APPROACH TO CREATE "FORECASTING" AND "EXPLAINING" MORBIDITY MODELS (IN ASTRAKHAN RICKETTSIOSIS FEVER AND CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER) 535

Rezaei E., Jamali E., Foroozanfar Z., Ataei F., Beheshti S., Joulaei H.
ASSESSMENT OF PROTEIN S AND C LEVEL AND ITS RELATIONSHIP WITH HEALTH-RELATED FACTORS IN PEOPLE LIVING WITH HIV: A CROSS-SECTIONAL STUDY 549

Shafiekhani M., Abolghasemi S., Asgharpour M., Zare Z., Negahban H., Akbari R., Nikoupour H., Roozbeh J., Oliaie F., Yahyapour Y., Geraili Z., Barari M., Ebrahimpour S., Baziboroun M.
POST-COVID-19 COMPLICATIONS IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS 559

Barilo A.A., Smirnova S.V.
FUNGAL ALLERGY AS A RISK FACTOR FOR DEVELOPING ROSACEA 567

Short communications

Konyshev I.V., Dudina L.G., Morozova N.A., Byvalov A.A.
ADHESIVENESS OF THE SPECIFIC PHAGES TO YERSINIAE CELLS ASSESSED BY OPTICAL TRAPPING 573

Gorbunov S.G., Mazankova L.N., Os'kin A.N.
TLR3 AND TLR7 PROGNOSTIC ROLE IN EARLY PEDIATRIC ROTAVIRUS INFECTION 579

For the practical physicians

Kalikyan Z.G.
ANTIBIOTICS HYPERSENSITIVITY REACTIONS DURING COVID-19 PANDEMIC 586

Methods

Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Melnicova E.V., Gorelova G.V.
METHOD FOR IDENTIFICATION OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* bv. *TRYPTOPHANDESTRUENS* AND ITS SUBBIOVARS A AND B 591

Instructions to Authors 597

Author index 600

Subject index 600

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 409–429

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 409–429

АУТОИММУННЫЙ СТРЕПТОКОККОВЫЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ: ПРОБЛЕМА НЕФРИТОГЕННОСТИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Л.А. Бурова, А.Н. Суворов, П.В. Пигаревский, Артем А. Тотолян

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Острый постстрептококковый гломерулонефрит обычно возникает как осложнение после перенесенной стрептококковой инфекции в силу несвоевременной или неадекватной антибиотикотерапии. Этиология постстрептококкового гломерулонефрита изучена достаточно полно. И клиницисты, и микробиологи сегодня не отрицают главенствующую роль *Streptococcus pyogenes* (стрептококк серологической группы А, СГА). Обычно возникновение гломерулонефрита принято связывать с так называемой «нефритогенностью» СГА, о чем нередко судят по появлению и накоплению в крови больных антител к антигенам и экстрацеллюлярным продуктам стрептококковой клетки. Данная трактовка достаточно вольная и скорее всего свидетельствует о принадлежности штамма, а не о его нефритогенности. Многим продуктам СГА разные авторы отводили и до сих пор приписывают роль ведущего «нефритогенного» фактора. На роль нефритогена претендуют перекрестнореагирующие антигены, стрептокиназа, цистеиновая протеиназа, эндострептозин — белок клеточной мембраны СГА, фермент глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа обладающий тропностью к плазмину. Вопрос требует тщательного анализа, поскольку перечисленные стрептококковые продукты встречаются в почечных биоптатах, как и антитела к ним в крови больных. Что касается самого понятия «нефритогенность», то на сегодня оно убедительно не привязано ни к одному конкретному продукту стрептококковой клетки. На протяжении многих лет многие предполагаемые стрептококковые нефритогенные антигены изучались без определенного подтверждения их связи с гломерулонефритом. Рассмотрению последних посвящен данный обзор на примере генеза острого гломерулонефрита и анализа ряда бактериальных продуктов в качестве пусковых звеньев процесса. Процесс может быть воспроизведен экспериментально на кроликах путем внутривенного введения убитой нагреванием культуры *Streptococcus pyogenes*. В наших опытах использовались штаммы М-типов 1, 4, 12, 15, 22. Они продуцировали М-протеины и обладали способностью связывать иммуноглобулин G человека и кролика за счет взаимодействия с Fc-частью молекулы IgG. В многочисленных сериях экспериментов получен ряд доказательств, непосредственно указывающих на роль IgGFc-рецепторных белков СГА в качестве нефритогенного фактора, инициирующего острое воспаление клубочкового аппарата почек. Работы последних лет, несмотря на условность схем моделирования, подтвердили роль стрептококковых Fcγ-связывающих белков в инициации гломерулонефрита при введении животным убитых IgGFc-позитивных СГА. Такой подход исключал из числа кандидатов в инициирующие факторы большую группу бактериальных внеклеточных агентов. В данном обзоре мы постарались подробнее остановиться на начальной стадии острого постстрептококкового гломерулонефрита, на природе его пусковых звеньев, рассчитывая пробудить

Адрес для переписки:
Бурова Лариса Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-05-42.
E-mail: lburova@yandex.ru

Contacts:
Larisa A. Burova
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academic Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-05-42.
E-mail: lburova@yandex.ru

Для цитирования:
Бурова Л.А., Суворов А.Н., Пигаревский П.В., Тотолян Артем А. Аутоиммунный стрептококковый гломерулонефрит: проблема нефритогенности Streptococcus pyogenes // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 409–429. doi: 10.15789/2220-7619-ASG-8491

Citation:
Burova L.A., Suvorov A.N., Pigarevsky P.V., Totolian Artem A. Autoimmune streptococcal glomerulonephritis: the Streptococcus pyogenes-related nephritogenicity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 409–429. doi: 10.15789/2220-7619-ASG-8491

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ASG-8491

интерес к данной проблеме с целью изучения механизмов неиммунного связывания иммуноглобулинов патогенными микроорганизмами в постинфекционной патологии. Нестандартный взгляд на патогенез постинфекционных осложнений СГА-инфекции может позволить, в отличие от иных подходов, по-новому подойти к их профилактике или лечению, что подчеркнет перспективность приведенных представлений.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes, постстрептококковый гломерулонефрит, факторы нефритогенности, стрептококковые Fcγ-связывающие белки.*

AUTOIMMUNE STREPTOCOCCAL GLOMERULONEPHRITIS: THE *STREPTOCOCCUS PYOGENES*-RELATED NEPHRITOGENICITY

Burova L.A., Suvorov A.N., Pigarevsky P.V., Totolian Artem A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Acute post-streptococcal glomerulonephritis usually occurs as a complication after a streptococcal infection due to untimely or inadequate antibiotic therapy. The etiology of post-streptococcal glomerulonephritis has been studied rather comprehensively. Today, both clinicians and microbiologists do not deny the dominant role of *Streptococcus pyogenes* (streptococcus attributed to serological group A, GAS). Usually, emergence of acute post-streptococcal glomerulonephritis (APSGN) is associated with the so-called GAS-related "nephritogenicity" often judged by appearance and accumulation of antibodies to the antigens and extracellular products of streptococcal cells in patient blood. This interpretation is quite loose and most likely evidence about a link to the bacterial strain, rather than its nephritogenicity. Many studies refer and still attribute a leading role of "nephritogenic" factors to various streptococcal antigens and related biologically active products. Streptococcal nephritogenic factors include cross-reacting antigens, streptokinase, cysteine proteinase, endostreptosin — a GAS cell membrane protein as well as plasmin-tropic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Nephritogenicity of all such streptococcal products is suspected to result from the fact that they are found in renal biopsies like specific patient blood serum antibodies. Regarding a term of nephritogenicity, it has been evidenced that it cannot be attributed to any specific streptococcal cell product. This review attempted to analyze a number of bacterial products as starting factors triggering this process. APSGN can be reproduced experimentally in rabbits by intravenous administration of a heat-killed *Streptococcus pyogenes* culture. In our experiments, strains of serotypes 1, 4, 12, 15, 22 were used. They produced M-proteins and had the ability to bind human and rabbit immunoglobulin G by interacting with the Fc part of the IgG molecule. In numerous series of experiments, evidence was obtained regarding the initiating role of GAS IgGFc-receptor proteins in developing APSGN. Recent studies confirmed the role of streptococcal IgGFc-binding proteins in the initiation of glomerulonephritis after animals were inoculated with temperature-killed IgGFc-positive GAS. This approach excluded a large group of bacterial extracellular agents from the list of APSGN-initiating candidates. An unconventional view on the pathogenesis of GAS-infection-coupled complications may allow approaching their prevention or new treatment strategies.

Key words: *Streptococcus pyogenes, poststreptococcal glomerulonephritis, factors of nephritogenicity, streptococcal Fcγ-binding proteins.*

Введение

Острый постстрептококковый гломерулонефрит (acute poststreptococcal glomerulonephritis — APSGN) обычно возникает как осложнение после перенесенной острой стрептококковой инфекции при несвоевременной или неадекватной антибиотикотерапии, часто заканчивается хронизацией процесса, приводя к инвалидизации пациентов. Такие больные нередко нуждаются в заместительной терапии: гемодиализе и трансплантации. В мире ежегодно регистрируется 111 млн случаев стрептококковой пиодермии и 616 млн случаев фарингита стрептококковой этиологии [23]. APSGN регистрируется в пределах между 9,5 и 28,5 новых случаев на 100 000 индивидуумов в год [77]. Изучение патогенеза APSGN продолжается и в наши дни, что указывает на наличие в этом вопросе проблемных положений. Исследователи согласны с тем, что APSGN следует трактовать как острое воспаление, имеющее иммунопатологическую природу. В пользу иммунопатологической природы говорит связь данного осложнения с изменением реактивности организма, на что, в частности, указывает бессимптомный промежуток времени между СГА-инфекцией и APSGN: при «глоточной» инфекции — 1–3 недели, при «кожной» — 3–4 недели. Такой срок необходим организму для мобилизации механизмов приобретенного иммунитета: активации, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток и индукции синтеза антител.

Этиология постстрептококкового гломерулонефрита изучена достаточно полно. Клиницисты и микробиологи сегодня не отрицают главенствующую роль микроорганизмов из рода *Streptococcus*, в основном *Streptococcus pyogenes* (β-гемолитический стрептококк серологической группы А, СГА). APSGN обычно возникает по-

сле перенесенной острой инфекции, вызванной стрептококками группы А определенного М-типа или *emm*-генотипа. Это стрептококки М-типов 1, 2, 4, 12 либо 47, 49, 55, 57 и 60; первые, как правило, паразитируют в верхних дыхательных путях и являются причиной инфекций в них, а вторые — на коже человека и вызывают пиодермию [75, 76]. Однако сегодня признано, что стрептококки группы А не обладают «монополией» на «нефритогенность». Исследования отдельных случаев и эпидемических вспышек показали, что гломерулонефрит может развиваться и после инфекций, вызываемых *Streptococcus zooepidemicus* [13, 15], *Streptococcus pneumoniae* [73], *Streptococcus constellatus* [12] и *Streptococcus anginosus* [54].

Обычно возникновение APSGN принято связывать с так называемой «нефритогенностью» СГА, о чем нередко судят по появлению и накоплению в крови больных антител к экстрацеллюлярным продуктам стрептококковой клетки, как, например, к стрептолизину-О, стрептокиназе, эритрогенному токсину В, гиалуронидазе, ДНКазе В, энолазе или к М-протеину. На самом деле данная трактовка достаточно вольная и скорее всего свидетельствует о принадлежности штамма, а не о его нефритогенности. Этот нюанс весьма важен в патогенезе APSGN. Он требует идентификации действительно нефритогенного начала или фактора СГА, то есть определяющего его агента.

Многим продуктам СГА разные авторы отводили и до сих пор приписывают роль ведущего «нефритогенного» фактора. Что касается самого понятия «нефритогенность», то на сегодня оно убедительно не привязано ни к одному конкретному продукту стрептококковой клетки. На протяжении многих лет предполагаемые стрептококковые нефритогенные антигены изучались без определенного подтверждения их связи с гломерулонефритом [75, 77].

Патогенез APSGN исследуется главным образом в опытах на животных. Но при его моделировании надо учитывать, что «нефритогенные» СГА в натуральных условиях являются патогенами исключительно для человека, в организме которого они имеют свои экологические ниши, не соответствующие модельным нишам лабораторного животного. Именно поэтому в эксперименте на кроликах, крысах и мышах модель всегда будет носить условный отпечаток, особенно при интерпретации данных. Вывод делается на основании сочетанного эффекта стрептококковых и почечных антигенов. Мы полагаем, что ведущую роль в этом тандеме трудно отдать какому-то одному из них, поскольку, как правило, не приводится характеристика использованного штамма СГА.

McIntosh R.M. с соавт. [56, 57, 58] первыми поставили вопрос о роли взаимодействия СГА с иммуноглобулинами человека в генезе APSGN. Были выдвинуты представления о возможной роли анти-IgG-антител в этой патологии. Они показали, что нейраминидаза *Streptococcus pyogenes* вызывает десиализацию IgG и аутологичных анти-IgG-антител, и обнаружили их депозицию в почечной ткани кроликов, инфицированных СГА. Анализ показал, что анти-IgG- и анти-IgM-аутоантитела появлялись у большинства пациентов с APSGN в первую неделю заболевания. В связи с этим следует понять условия, при которых собственные IgG человека (или подопытного животного) могут приобрести свойство аутоантигена.

В генезе APSGN участвуют гуморальные и клеточные иммунологические механизмы. К первым относятся реакции антигенов со специфическими антителами, в результате которых образуются либо циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), либо локальные иммунные комплексы (ИК) непосредственно в тканях [7, 8, 10]. В последнем случае многое определяется катионным зарядом антигенов, их способностью проходить сквозь отрицательно заряженную базальную мембрану гломерулы, приводя к избытку того или иного антигена в виде почечных депозитов, которыми в значительной мере определяется выраженность патогенного эффекта. Клеточные реакции заключаются в мобилизации различных популяций лейкоцитов, в продукции ими многочисленных медиаторов иммунного воспаления.

С позиций иммунологии нет смысла противопоставлять понятия «иммунокомплексный» и «аутоиммунный», поскольку первое характеризует механизм процесса, а второе — причину [8, 11]. Условность этих понятий очевидна, ибо они оба одновременно являются иммунокомплексными и аутоиммунными с той лишь разницей, что в первом случае аутоантиген входит в состав ЦИК, а во втором — фиксирован в ткани. Само понятие «иммунокомплексный» условно, поскольку образование комплексов в качестве активного начала имеет место в обоих случаях, независимо от условий их формирования — в циркуляции или местное, в ткани. Кроме того, у больных аутоиммунным APSGN наблюдается преобладание ряда тканевых антигенов главного комплекса гистосовместимости, что указывает на наследственную предрасположенность в механизме данной патологии. С этим обстоятельством связывают чувствительность тканей к нефритогенным СГА и недостаточную активность макрофагов в элиминации ЦИК.

Считается, что в иммунокомплексном процессе в качестве стимулирующего агента могут выступать антигены и «паразита», и «хозяина», которые «перерабатываются» макрофага-

ми, что приводит к продукции специфических антител. Иммунные комплексы циркулируют в крови и лимфе, откладываясь в гломерулах. Отложение ЦИК на базальных мембранах почечных клубочков зависит от размера ЦИК, избытка антигена в них и величины электрических зарядов мембран и ЦИК.

Пул нефритогенных антигенов СГА в комплексе с соответствующими антителами сам по себе не повреждает ткани, но активирует многокомпонентные биосистемы организма: системы комплемента, коагуляции крови и калликреин-кининовую систему. В процессе участвует несколько видов клеток крови: полиморфноядерные лейкоциты, моноциты и тромбоциты. Активация комплемента влечет за собой:

– высвобождение его вазоактивных пептидов (C3a, C5a), что ведет к расширению сосудов, повышению их проницаемости с выходом белков и клеток в очаг воспаления;

– высвобождение хемоаттрактантов, привлекающих в очаг нейтрофилы с выделением кислородных радикалов, гидролаз и протеаз (коллагеназа, эластаза);

– фиксацию иммунных комплексов на мембранах макрофагов, нейтрофилов, тромбоцитов через Fcγ-рецепторы с последующим выбросом пирогенов, гидролаз, биогенных аминов и цитокинов;

– активацию системы свертывания крови и кининообразования.

Депозиция ЦИК в стенках сосудов чревата васкулитами и частым поражением сосудов почек, кожи и суставов. Места отложения комплексов зависят от анатомических и гидродинамических особенностей тканей и органов — там, где плазма крови фильтруется через стенки мелких капилляров под высоким гидростатическим давлением (гломерулы почек, синовиальная ткань суставов). При избытке антител или недостатке системы комплемента формируются нерастворимые ИК, склонные к седиментации.

Мобилизация полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитов ведет к их накоплению на базальной мембране гломерул. Их лизосомальные ферменты повреждают мембрану, образуя «энзиматическую перфорацию». Кроме того, лейкоциты выделяют медиаторные вещества, вызывающие воспаление в ткани, за которым следует повреждение гломерул. К ним относятся провоспалительные цитокины, простагландины и лейкотриены, стимулирующие пролиферацию клеток. Инфильтрация ткани лейкоцитами повреждает мембраны и вызывает перекисное окисление липидов в тканях.

Аутоиммунный APSGN непосредственно в гломерулах развивается при нефрите, ассоциированном с HLA-антигенами DR2 (при прогрессирующем процессе) или DR3 (при мембранозном процессе). Развитие по данному типу отличается от вызываемого ЦИК лишь начальным звеном, в то время как остальные звенья имеют общие проявления. «Ловушками» для антител в этих случаях служат собственные антигены клубочка. В результате формирования комплексов образуются мезангиальные, субэпителиальные или субэндотелиальные депозиты IgG и C3-комплемента. При этом, мембраноатакующий комплекс комплемента C5–C9 деполимеризует белки базальной мембраны, усиливая локальную перфорацию. В результате повреждения активируется калликреин крови. Представляя собой группу сериновых протеаз, он участвует в воспалении и расщеплении белков с образованием кининов, которые увеличивают проницаемость мембраны капилляров и повышают протеинурию. Необходимым условием развития процесса является снижение функции пула Т-лимфоцитов, в норме обеспечивающих толерантность к собственным антигенам. На этом фоне синтез аутоантител к компонентам базальной мембраны ведет к ее дальнейшему разрушению [8, 11].

В генезе APSGN важную роль играют лимфоциты, действуя во многих эпизодах патологической цепочки, выделяя медиаторы и повреждающие агенты: свободные радикалы кислорода, провоспалительные цитокины, ферменты, факторы активации тромбоцитов, стимуляции роста и пролиферации клеток клубочков, в первую очередь подоцитов и клеток мезангия; усиливается склерозирование ткани и формируются условия для хронической почечной недостаточности. Дезинтеграция гломерул приводит к повреждению нефронов и синтезу «нефротоксических» аутоантител. Формируются иммунные комплексы типа аутоантиген–аутоантитело, что в итоге усугубляет первичное повреждение и вызывает образование все новых аутоантигенов, аутоантител и иммунных комплексов. Отложение фибрина способствует хронизации процесса. При небольших депозитах, они фагоцитируются и рассасываются в результате местной активации фибринолиза, что способствует излечению. Если же выпадение фибрина и тромбообразование усиливаются, то процесс заканчивается облитерацией капилляров клубочков. При обширных отложениях или ослаблении фибринолиза, воспаление в почках приобретает хроническое течение и завершается нарушением функции органа.

В данном обзоре мы постарались подробнее остановиться на начальной стадии APSGN, на факторах нефритогенности СГА и на современных доказательствах его патогенеза с целью пробуждения интереса к проблеме изучения

механизмов неиммунного связывания иммуноглобулинов патогенными микроорганизмами в постинфекционной патологии.

Антигены и биологически активные продукты *Streptococcus pyogenes*, претендующие на роль нефритогенных факторов

Многие продукты жизнедеятельности СГА изучались на предмет способности индуцировать поражение почек На роль нефритогена, претендуют перекрестно-реагирующие антигены (ПР-антигены) [31, 32, 78, 79], стрептокиназа (Ska) [65, 66, 67]; цистеиновая протеиназа (SpeB) [16, 30, 53, 60], эндострептозин — белок клеточной мембраны СГА (SCM) [48, 49, 70, 84, 91], а также поверхностный белок СГА с ферментативными свойствами — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH) в качестве антигена, взаимодействующий с антителами в крови лиц, переболевших APSGN [68, 69, 92]. Вопрос требует тщательного анализа, поскольку перечисленные стрептококковые продукты встречаются в почечных биоптатах, а антитела к ним — в крови больных.

Перекрестно-реагирующие антигены. При аутоиммунном процессе в почках роль пускового механизма длительное время приписывали М-белку нефритогенных СГА, некоторые участки которого обладают антигенным сходством с белками базальной мембраны почечного клубочка. Им отводилась роль так называемых «перекрестно-реагирующих антигенов» в реализации «молекулярной мимикрии» в генезе APSGN. Согласно этим представлениям, ПР-антигенами микроба и «хозяина» служат гомологичные либо похожие аминокислотные последовательности их белков [31, 43]. По этой версии антигенная «мимикрия» являлась основой аутоиммунного механизма повреждения органа.

Возможность участия ПР-антигенов в инициации данной патологии с теоретических позиций вполне допустима, поскольку эволюция могла отобрать и сохранить в белках млекопитающих гомологичные или схожие аминокислотные последовательности белков бактерий. У стрептококков групп A, C и G обнаружен ген, кодирующий белок, перекрестно-реагирующий с миозином и антигенами главного комплекса гистосовместимости человека за счет 19% гомологии и 62% сходства в рамках полипептида из 151 аминокислотного остатка [45]. Можно привести и другой пример: так антитела к коллагену базальной мембраны и к ламинину обнаруживали в сыворотках крови пациентов с постстрептококковым гломерулонефритом [44]. Высокое структурное сходство М-белков СГА и тканевых белков хозяина, таких как миозин и тропомиозин, позволило ряду исследователей выдвинуть гипотезу о существовании перекрестно-реагирующих антител, направленных против перечисленных выше белков человека, в качестве возможной причины развития ревматической лихорадки и ревмокардита, связанных с инфекцией, вызываемой *Streptococcus pyogenes* [2, 31, 32, 78, 79]. Вопрос в другом — может ли «мимикрия» стать исходной причиной болезни? Если бы ПР-антигены инициировали повреждение ткани, то антимикробными сыворотками можно было бы моделировать патологию в органах. Однако такая возможность вряд ли может считаться доказанной.

Особняком стоят работы, в которых предпринимались попытки обнаружить ПР-антигены в клеточных мембранах стрептококковых клеток (SCM). Показана способность моноклональных анти-SCM антител перекрестно реагировать с тканевой базальной мембраной, например, мышиных легких [34]. При внутрибрюшинном введении мышам гибридом, продуцирующих анти-SCM-антитела, у некоторых особей выявляли пневмонию. Тяжесть процесса зависела от дозы антител (0,4–1,6 мг/мышь) и числа клеток гибридом — (10^6–10^7/мышь). Считается, что эти данные указывают на существование ПР-антигенов между СГА и тканью легких у мышей, хотя пневмония в данном случае могла стать реакцией организма на чужеродный IgG-гибридомы. К сожалению, авторы прошли мимо сведений о перекрестных реакциях между базальными мембранами легких и почек. Наличие ПР-антигенов между ними обнаруживалось с помощью моноклональных анти-SCM антител [48, 49]. У пациентов с APSGN в 71,4% случаев выявляли анти-SCM антитела, реагирующие с продуктами химического (лаурил-сульфатом) «перевара» SCM, но не с растворимой в коллагеназе мембраны гломерул; перекрестные реакции между ними отсутствовали [70]. Согласно клиническим данным высокий уровень анти-SCM антител встречается у пациентов с APSGN, но не у лиц с неосложненной СГА-инфекцией [91]. Однако их место в инициации APSGN требует строгих доказательств. Одновременное присутствие анти-SCM- и анти-GBM-антител указывает на вовлеченность обеих структур в процесс, но еще не говорит в пользу пусковой роли этих ПР-антигенов в APSGN.

Представления об аутоиммунных механизмах APSGN, связанных с ПР-антигенами, на наш взгляд, требуют уточнений в связи с феноменом неиммунного взаимодействия патогенных СГА с иммуноглобулинами G и A [27,

47, 51, 52, 61], поставившим под сомнение роль ПР-антигенов в инициации патологического процесса в почечной ткани. Так была показана способность «нефритогенных» СГА неиммунно связывать как нормальный IgG, так и антитела любой специфичности посредством так называемых IgGFc-связывающих рецепторов (Fcγ) *Streptococcus pyogenes*. Именно эта активность М-белков у IgGFc-позитивных СГА, а не присутствие ПР-антигенов, позволяет «истощать» любые иммунные сыворотки [26]. Интересно оценить динамику исследований о роли ПР-антигенов в патогенезе аутоиммунных заболеваний за последние 20 лет, которые существенно изменили отношение исследователей к данной проблеме: если еще в 2000 г. в своем обзоре M. Cunningham писала о ПР-антигенах как о ведущих факторах развития постстрептококковых аутоиммунных заболеваниях и очень осторожно оценила наши первые публикации о роли стрептококковых Fc-связывающих белков в этой патологии [32], то в 2021 г. в опубликованных обзорах J.O. Mils и P. Gosh и B. Rodriguez-Iturbe [59, 75] уже нет ни слова о роли ПР-антигенов в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита, а обсуждается совсем другой механизм его развития, кстати, с цитированием наших данных, и основное внимание уделяется стрептококковым IgG-связывающим белкам в инициации гломерулонефрита. И только группа ученых из Австралии [78, 79] в статьях по ревматическим поражениям сердечной ткани обсуждают ПР-антигены в качестве возможных патогенетических факторов, способных индуцировать данную патологию.

Стрептокиназа (Ska). Этот экскретируемый продукт СГА способен активировать плазминоген крови в сериновую протеиназу — плазмин — в дополнение к плазмину, экспрессируемому эндотелием капилляров клубочка. По мнению авторов [66, 67], он является инициирующим звеном в генезе гломерулонефрита. Было показано, что введение СГА, экспрессирующего стрептокиназу генотипа *ska*1 или *ska*2 [42, 55, 65, 87], мышам линии BALB/c в подкожно имплантированные камеры сопровождается морфологическими изменениями в почках, лейкоцитарной инфильтрацией ткани гломерул, пролиферацией клеток мезангия и депозицией C3 компонента комплемента и IgG на базальной мембране клубочков. У части животных обнаружены антитела к стрептокиназе, а также ее депозиция на базальной мембране [65]. Следует, однако, отметить, что во избежание ошибок в трактовке экспериментов по моделированию APSGN, постулат о ведущей роли стрептокиназы в его генезе следует обязательно сопроводить доказательством ее способности активировать плазминоген экспериментального животного в плазмин. Выбор мышей в качестве модели не является оптимальным, поскольку стрептокиназа не преобразует плазминоген мыши в плазмин; ее активность проявлялась только в отношении плазминогена человека. Выделенная из нефритогенных СГА типов M1, M22 и M12 стрептокиназа A, как и стрептокиназа C (коммерческий препарат «Streptase»), преобразовывали в плазмин плазминоген человека, несколько слабее — кролика, но не мыши [3]. В наших экспериментах на кроликах с введением в имплантированные подкожно тканевые камеры живых стрептококков не удалось выявить роль стрептокиназы в индукции экспериментального гломерулонефрита [3]. Исходя из полученных данных, трудно объяснить, каким образом стрептокиназа может участвовать в генезе экспериментального гломерулонефрита, моделируемого на кроликах и, тем более, на мышах. Кроме того, СГА не связывают мышиный IgG, в отличие от кроличьего. Поэтому при моделировании APSGN, на наш взгляд, предпочтительнее использовать кроликов, а не мышей [3, 8].

Цистеиновая протеиназа. Эритрогенный экзотоксин B (SpeB) или внеклеточная цистеиновая протеиназа является еще одним фактором, претендующим на «титул» нефритогена. Было установлено, что цистеиновая протеиназа, как катионный белок, проходит через базальную мембрану клубочков и формирует иммунные комплексы *in situ*. В сыворотке реконвалесцентов обнаруживаются в высоком титре антитела к SpeB. Основными аргументами об участии цистеиновой протеиназы в генезе APSGN служат уровень анти-SpeB антител и обнаружение SpeB-антигена в биоптатах почки [30, 53]. Титры антител к нему у больных APSGN превосходили таковые у больных иной СГА-патологией, а сам токсин обнаруживался в 80% биоптатах при APSGN и лишь в 16% — в других случаях. Надо отметить, что при иммунизации мышей SpeB, он обнаруживался в гломерулах на фоне воспаления. Авторы считают SpeB продуктом нефрит-ассоциированных штаммов, между тем как в реальности его продуцируют 90% СГА, а ген *speB* присутствует у 100% СГА. Однако у *Streptococcus zooepidemicus* штамма MGCS10565, вызвавшего крупную эпидемию гломерулонефрита в Бразилии [13], в геноме отсутствовал ген экзотоксина B, что исключает инициирующую роль данного продукта в развитии APSGN. По мнению авторов исследования, сравнительный анализ генома микроорганизма указывает на необходимость критической оценки молекулярных механизмов патогенеза APSGN [13]. Поэтому, если эритрогенный токсин B и играет роль в развитии

APSGN, то, во-первых, явно неинициирующую, а во-вторых, не может быть его причиной во всех случаях.

Как преобладающий секретируемый продукт *Streptococcus pyogenes* SpeB влияет на многие проявления врожденного и адаптивного иммунитета, вызывая деградацию внеклеточного матрикса гломерул, иммуноглобулинов и комплемента, модифицирует активность цитокинов, хемокинов и других белков «хозяина» [41, 63]. Высокий уровень экспрессии данного белка в организме затрудняет изучение его реального вклада в патологию почек.

Этот список патогенетически активных продуктов СГА может быть продолжен. Общим для них является наличие специфических антител и иммунных комплексов в гломерулах. Необходимо подчеркнуть, что большинство суждений о роли тех или иных продуктов в генезе APSGN сделаны на стадии иммунного воспаления или при изучении клинических материалов от больных с развитой картиной патологии, что затрудняет идентификацию действительного нефритогена, запускающего APSGN.

Стрептококковая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Этот СГА фермент был идентифицирован V. Pancholi и V.A. Fischetti [72]. Позднее данный белок японскими исследователями был рассмотрен в качестве антигена, взаимодействующего с антителами в крови лиц, переболевших APSGN [68, 69]. Гены, кодирующие GAPDH, выделены из СГА от больных APSGN, и имеют 99,8% гомологию между собой. GAPDH обнаруживали в почечных биоптатах больных с APSGN, но на сроках, не совпадающих с выявлением депозиции C3-комплемента и IgG в почечной ткани. Антитела чаще выявляли у больных гломерулонефритом, чем у лиц с СГА-инфекцией. Проникнув в гломерулы на ранних стадиях, этот антиген проявляет тропность к плазмину — энзиму, продуцируемому эндотелием капилляров. Их комплекс считают инициирующим APSGN, а сам GAPDH был назван рецептором плазмина, ассоциированным с нефритом (NAPlr). Считается, что комплекс плазмина с NAPlr играет значительную роль в развитии APSGN. Уровни антител против NAPlr обнаружены в 92% сывороток выздоравливающих пациентов с APSGN и в 60% случаев неосложненных стрептококковых инфекций в Японии. NAPlr присутствует в ранних биоптатах, полученных от больных с APSGN. В этих случаях рекомендуется терапевтический аферез NAPlr для его удаления, что блокирует процесс в почках в доклинической стадии. На наш взгляд, это не указывает на его инициирующую активность, а скорее свидетельствует об активном его участии в протеолизе белков почечных гломерул. При этом уровень антител скорее говорит о величине антигенного стимула, а не об участии NAPlr в патогенезе. При анализе роли антител к NAPlr надо иметь в виду, что уровень антител нарастает в течение года, между тем как APSGN развивается в первые недели после перенесенной СГА-инфекции.

Oda T. с соавт. [68], отстаивающие роль плазминового рецептора в качестве нефритогенного фактора, описали его присутствие в гломерулах с другим кандидатом в нефритогенный агент — цистеиновой протеиназой (SpeB), находили ее в нейтрофилах, эндотелии, мезангиальных клетках и, отчасти, в макрофагах. Никаких данных о связи этих находок со стадией APSGN, с воспалением или серологическими показателями авторы не приводят, что не позволяет судить об инициирующей роли данного фактора в развитии APSGN. Плазмин — сериновая протеаза широкого спектра действия — обладает способностью разрушать мезангиальную ткань в почках. В здоровом организме плазмин постоянно образуется под действием урокиназы, не причиняя вреда ткани почек, и NAPlr присутствует у большинства людей. Эти данные свидетельствуют о наличии множества антигенов с нефритогенной активностью или неизвестной причине APSGN. Не все антигены или антитела, обнаруженные в почечных клубочках, могут приводить к патологическим изменениям в органе, особенно в его начале. За результатом высокотехнологичных поисков порой могут скрываться методологические недочеты, что и приводит к обилию и пестроте взглядов на одни и те же процессы [8, 16].

Стрептококковые иммуноглобулин G-связывающие белки (IgGFc-связывающие белки или Fcγ-белки). Способность микробов связывать Fc-фрагмент молекулы IgG человека и ряда млекопитающих была первоначально описана у *Staphylococcus aureus* — рецептором служил протеин A [36]. Представления об аутоиммунных механизмах APSGN, на наш взгляд, требуют уточнений в связи с феноменом неиммунного взаимодействия патогенных СГА с IgG и IgA человека, впервые описанным учеными Лундского Университета (г. Лунд, Швеция) [27, 47, 52, 61]. Ими была показана способность «нефритогенных» СГА неиммунно связывать как нормальный IgG, так и антитела любой специфичности, посредством так называемых стрептококковых IgG Fc-связывающих белков-рецепторов. Именно эта активность M-белков у IgGFc-позитивных СГА, а не присутствие ПР-антигенов, позволяет «истощать» любые иммунные сыворотки. Белки *S. pyogenes*, связывающие все четыре подкласса IgG человека относятся к II типу IgGFc-рецепторов [61]. Описаны также стрептококковые Fcγ-рецепторные белки для ЦИК [2, 6, 17] и агрегированного IgG [25, 80].

Streptococcus pyogenes условно подразделяют на «глоточные» и «кожные», «ревматогенные» и «нефритогенные» М-серотипы. Глоточные инфекции чаще осложняются поражением сердца, а кожные — почек. Нами была показана следующая частота выделения IgGFc-позитивных СГА из разных источников: от больных APSGN — в 78%; от больных с хронической инфекцией — в 92,5%; и от контактных и условно здоровых — в 40% случаев [8].

Недавно описан любопытный феномен, важный для понимания системы паразит–хозяин: характер взаимодействия СГА с антителами определялся местом колонизации бактерий и концентрацией антител. В крови это взаимодействие происходило, преимущественно, по схеме «антиген–антитело» (посредством Fab-фрагментов антител), а в носоглотке (лимфоузлы), где концентрация IgG ниже, связь формировалась по типу неиммунной Fc-рецепции [64]. В последнем случае микроорганизм был защищен от фагоцитов, между тем как в условиях циркуляции он подвержен опсонизации и фагоцитированию. В сочетании с недостаточной терапией в глотке возникают условия, способствующие размножению и долговременному пребыванию стрептококков, а Fc-рецепторы бактерий становятся фактором выживаемости СГА, что может повлиять на исход инфекции.

Иммунитет к *S. pyogenes* типоспецифичен. Он определяется М-белками (Emm, Mrp и Enn). Их гены образуют Mga-регулон [1, 39, 40, 89] и входят в него в различных сочетаниях, где *emm*-ген является постоянным компонентом и основой генотипирования СГА [1, 33]. Молекулы М-белков состоят из гипервариабельной (определяет типовую специфичность), вариабельной и консервативной областей [59]. Особенности структуры белка «диктуют» спектр взаимодействия различных М-типов СГА с белками крови млекопитающих (фибронектин, альбумин, фактор Н комплемента, фибриноген, фибрин), а также с иммуноглобулинами G (Fc-рецепция) [2, 59]. Описаны три М-белка, различающиеся по Fc-связыванию IgG и IgA: белок Emm связывает все подклассы обоих иммуноглобулинов; белок Mrp связывает IgG1, IgG2 и IgG4 [59]; белок Arp связывает преимущественно IgA обоих подклассов и в меньшей степени IgG3. Связь белка Arp с IgA и с IgG3 осуществляется разными его сайтами [51]. Известно, что молекулы IgG взаимодействуют с М-белками в области доменов C2-C3 тяжелой цепи за счет за счет His435, Tyr436, His433 и His310 аминокислотных остатков в этой части IgG [81].

Если допустить, что именно IgGFc-связывающие белки служат фактором, инициирующим поражение гломерул, то напрашивается следующая схема последовательности событий: введенные подопытному животному в кровь бактерии «извлекают» из нее массу молекул IgG (по современным представлениям до 400 молекул на КФЕ бактерии); этот переход из жидкой фазы в связанное состояние трансформирует IgG в аутоантиген; в ответ происходит продукция анти-IgG-аутоантител к IgG животного с формированием ЦИК, которые вызывают начальное поражение ткани почек. По-видимому, взаимодействие IgGFc-позитивных СГА с организмом не проходит бесследно для партнеров. «Одеваясь» в белки «хозяина», стрептококки мимикрируют под него, мешая разделению «чужого» и «своего»; преодолев факторы врожденной защиты, они формируют новую угрозу в виде агрессивных иммунных комплексов. С этих позиций нефритогенность определяется как способность IgGFc-позитивных СГА индуцировать формирование ЦИК из двух молекул IgG, а фактором нефритогенности служит IgGFc-связывающий белок бактерий. Исследования R.M. McIntosh с сотрудниками говорят именно в пользу такой трактовки патогенеза начального поражения ткани гломерул [56, 57, 58]. Почти 50 лет назад ими впервые был поднят вопрос о роли взаимодействия иммуноглобулинов человека и продуктов СГА в патогенезе APSGN [56]. В нем говорилось о возможной роли анти-IgG-антител в этой патологии. Их синтез в организме связывали с действием на IgG фермента нейраминидазы штамма СГА, выделенного от больного гломерулонефритом. Однако в культуральной жидкости, свободной от клеток, фермент не обнаруживался. Несмотря на это, APSGN продолжали рассматривать как эффект от антигенного преобразования IgG нейраминидазой и последующего синтеза анти-IgG-антител. На наш взгляд, большего внимания заслуживает другой механизм иммунокомплексного поражения почек, который до конца XX в. находился вне внимания исследователей. В нем речь идет об особых условиях формирования и накопления в организме анти-IgG-антител. Их обнаружение может быть связано с антигенной модификацией нормальных IgG крови и лимфы и последующим образования иммунных комплексов IgG–анти-IgG, обнаруживаемых более чем в 90–95% случаев APSGN. Поэтому вернемся к условиям, при которых собственные IgG могут стать аутоантигенами.

Хорошо известно, что СГА с выраженным синтезом М-белка активно связывают IgG. Это позволяет составить сценарий формирования анти-IgG-антител и их роли в APSGN. Выше мы касались этого вопроса, говоря о крупном фокусе IgG молекул в области глоточного кольца

лимфоидной ткани, участвующей в иммунном ответе организма. Совместная локализация в едином фокусе бактерий с Fcγ-рецепторами и IgG обеспечивает их взаимодействие. В условиях инфекции связанный IgG подвергается «атаке» энзимами СГА — IgG-деградирующим ферментом (IdeS), эндогликозидазой (EndoS) и экзотоксином B (SPEB), расщепляющими γ-цепь нативного IgG в шарнирной области молекулы [90]. Данная область отличается от сайта расщепления папаином [28, 29]. При этом образуются фрагменты IgG, которые создадут мощный аутоантигенный стимул для продукции аутоантител к «обломкам» IgG. Этот процесс может вызвать накопление антител и формирование ЦИК по типу IgG–анти-IgG. Этот процесс должен быть цикличным, поскольку «освободившиеся» от связанного IgG стрептококковые Fc-рецепторные белки будут «захватывать» все новые и новые молекулы IgG, и события будут повторяться до тех пор, пока лечение не прервет этот цикл. Предполагаемый цикл событий обычно приводит к активации системы комплемента и воспалению. За первичным поражением ткани гломерул следуют энзиматические реакции, вызывающие дегенерацию ее структур и образование аутоантигенов. Начавшись как иммунокомплексный, процесс постепенно становится аутоиммунным.

Ведущие положения выдвигаемой нами гипотезы [8, 9, 10] состоят в следующем:

– высоковирулентные М-позитивные СГА связывают молекулы нативного IgG за счет взаимодействия с Fcγ-белками бактерий; это неиммунное взаимодействие сопровождается образованием IgG-аутоантигенов;
– в результате антигенной трансформации в фокусе инфекции происходит накопление повышенных концентраций не только IgG-аутоантигена, но и продукция анти-IgG-аутоантител, специфически реагирующих с собственным IgG, а также антител к так называемым нефритогенным антигенам СГА;
– в крови образуются ЦИК по типу: IgG–анти-IgG, стрептококковые антигены–анти-СГА-антитела, которые обычно «выводятся» через почечный барьер посредством депозиции в тканевых структурах гломерул, привлекающей С3 компонент комплемента;
– отложения ЦИК и С3 компонента комплемента вызывают продукцию провоспалительных цитокинов и инфильтрацию тканей лейкоцитами (лимфоциты/макрофаги), что в итоге приводит к формированию очагового иммунного воспаления с последующей дегенерацией и деструкцией почечной ткани; процесс завершается гломерулонефритом с некоторой вариабельностью в морфологических проявлениях.

Схема развития постстрептококкового гломерулонефрита, согласно положениям данной гипотезы, представлена на рис. 1.

Экспериментальные доказательства нефритогенности IgGFc-связывающих белков *Streptococcus pyogenes* в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита

Эксперименты на кроликах подтвердили развитие патологии по изложенной схеме и показали, что за иммунным воспалением в ткани почек происходят дегенеративные, атрофические и фиброзные процессы, завершающиеся мембранозно-пролиферативным, а также фибропластическим поражением гломерул, сходными с APSGN у человека.

На кроликах были испытаны СГА разных М-серотипов или *emm*-генотипов (1, 4, 12, 15 и 22). При этом получен ряд доказательств в пользу этих представлений. Экспериментальный гломерулонефрит вызывали исключительно IgGFc-позитивные (но не IgGFc-негативные) штаммы СГА, обладающие IgGFcR-белками II типа; штаммы СГG, обладающие G-белком (IgGFc-белок III типа), вызывали APSGN в редких случаях; а штамм *Staphylococcus aureus* с А белком (IgGFc-связывающий белок I типа) не обладал нефритогенностью. Эти данные совпадают с клиническим материалом, согласно которому инфекция, в основном СГА и крайне редко СГG, может осложняться APSGN (табл. 1) [21].

В крови подопытных животных обнаруживали анти-IgG-антитела в титрах 1:80–1:640, в зависимости от срока забора проб и индивидуальных особенностей кроликов. В гломерулах наблюдали отложения IgG и С3 компонента комплемента. Их депозиция сопровождалась продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNFα и IL-6) и инфильтрацией тканей лимфоцитами/макрофагами (рис. 2), что в итоге приводило к формированию локального иммунного воспаления с последующей дегенерацией и деструкцией ткани: неравномерному утолщению мембран, пролиферации клеток мезангия, их проникновению между мембраной и разрушенным эндотелием. В капиллярах встречались разрушенные клетки крови. Происходили: гипертрофия и гибель подоцитов; склерозирование и атрофия капилляров гломерул, что указывало на развитие картины мембранозно-пролиферативного процесса (рис. 3). В контрольных опытах со штаммами СГG148 и Cowan I встречались лишь минорные изменения без деструкции гломерул, что подтверждает ведущую роль IgGFc-белков СГА

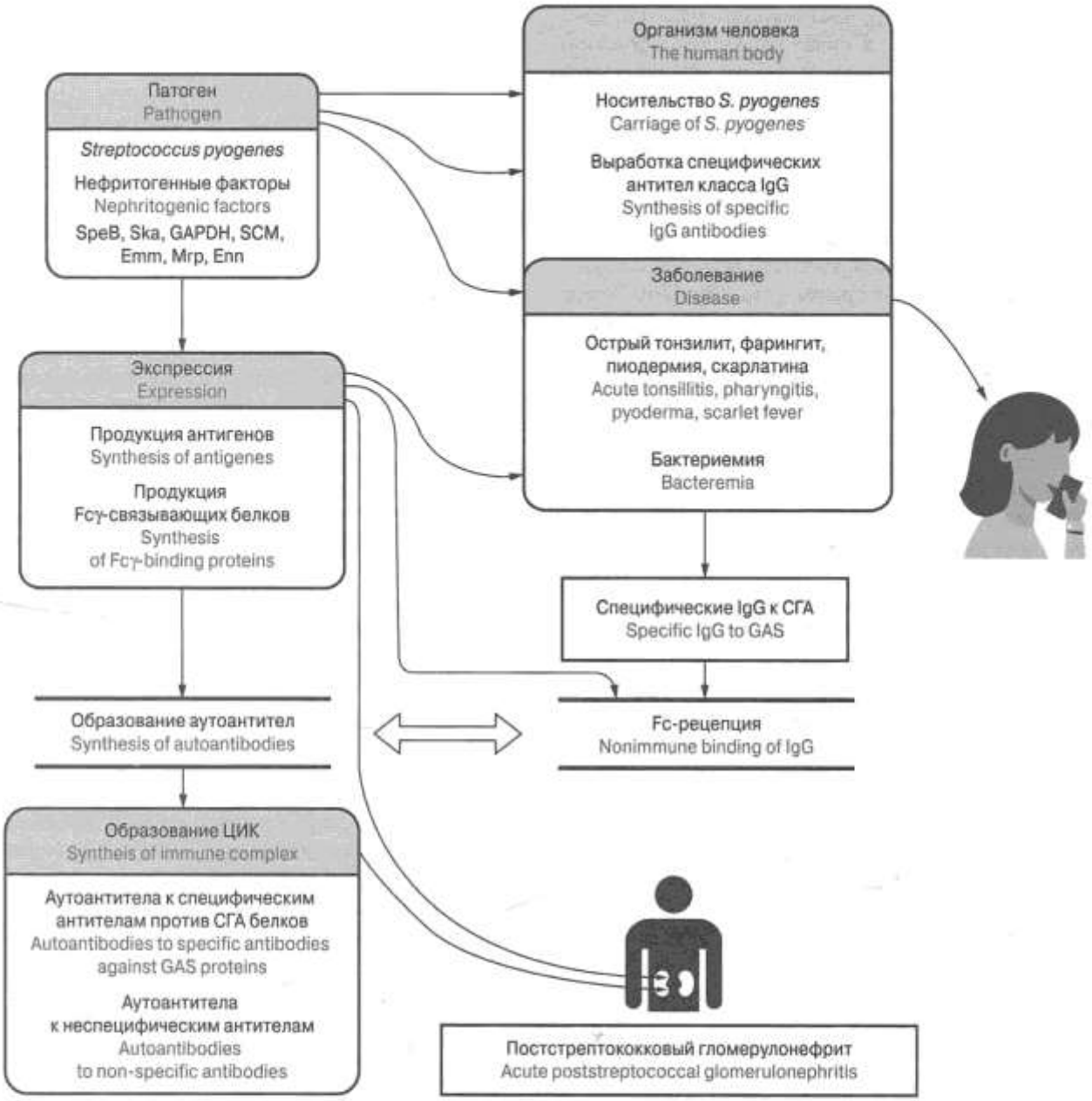


Рисунок 1. Схема развития постстрептококкового гломерулонефрита

Figure 1. A scheme of APSGN development

Таблица 1. Обобщенные данные экспериментов о связи между типами FcR-рецепторных белков и способности соответствующих видов бактерий вызывать гломерулонефрит

Table 1. Summarized experimental data on a relation between types of FcR-receptor proteins and a potential of relevant bacterial species to cause glomerulonephritis

Вид бактерий Bacterial species	**М-тип СГА или штамм** GAS M-type or strain	**Тип IgGFcR-белка** Type of IgGFc-binding protein	**Число кроликов с гломерулонефритом/ число использованных кроликов** Number of rabbits with glomerulonephritis/ total number of rabbits
Streptococcus pyogenes	M1	II	13/16 (81%)
	M4		2/2 (100%)
	M12		17/21(81%)
	M15		7/8 (87%)
	M22		17/19 (82%)
Streptococcus dysgalactie	G148	III	2/20 (10%)
Staphylococcus aureus	Cowan I	I	0/19

в инициации APSGN. Все последующие эксперименты подтверждали эти результаты [4, 5, 6, 10]. В следующих опытах изучали нефритогенную активность СГА типа M22 (AL168), имеющего два Fcγ-белка (Mrp и Emm), а также его мутанты, дефицитные по обоим или по одному М-белку (табл. 2) [9, 10, 20].

Результаты опытов вновь указывали на связь Fcγ-белков СГА с механизмом инициации APSGN и соответствовали картине мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита. Обнаруживались депозиты С3-комплемента, IgG и продукция провоспалительных цитокинов TNFα и IL-6. В отдельных случаях процесс охватывал и область проксимальных канальцев.

Близкие по характеру изменения выявлены при изучении нефритогенности штаммов типа M12 (табл. 3) [6, 10].

Указанные в табл. 3 клинические штаммы были произвольно выбраны из 21 штамма, выделенных от больных APSGN, и различались по Fc-связыванию иммунных комплексов. Позитивный по этому признаку штамм 257 индуцировал анти-IgG-антитела против IgG человека, за которыми следовали описанные выше изменения [6]. Штамм 305 не связывал иммунные комплексы и не обладал нефритогенностью.

Значимые данные в пользу обсуждаемого вопроса получены при изучении активности очищенных М (или IgGFc-связывающих) белков.

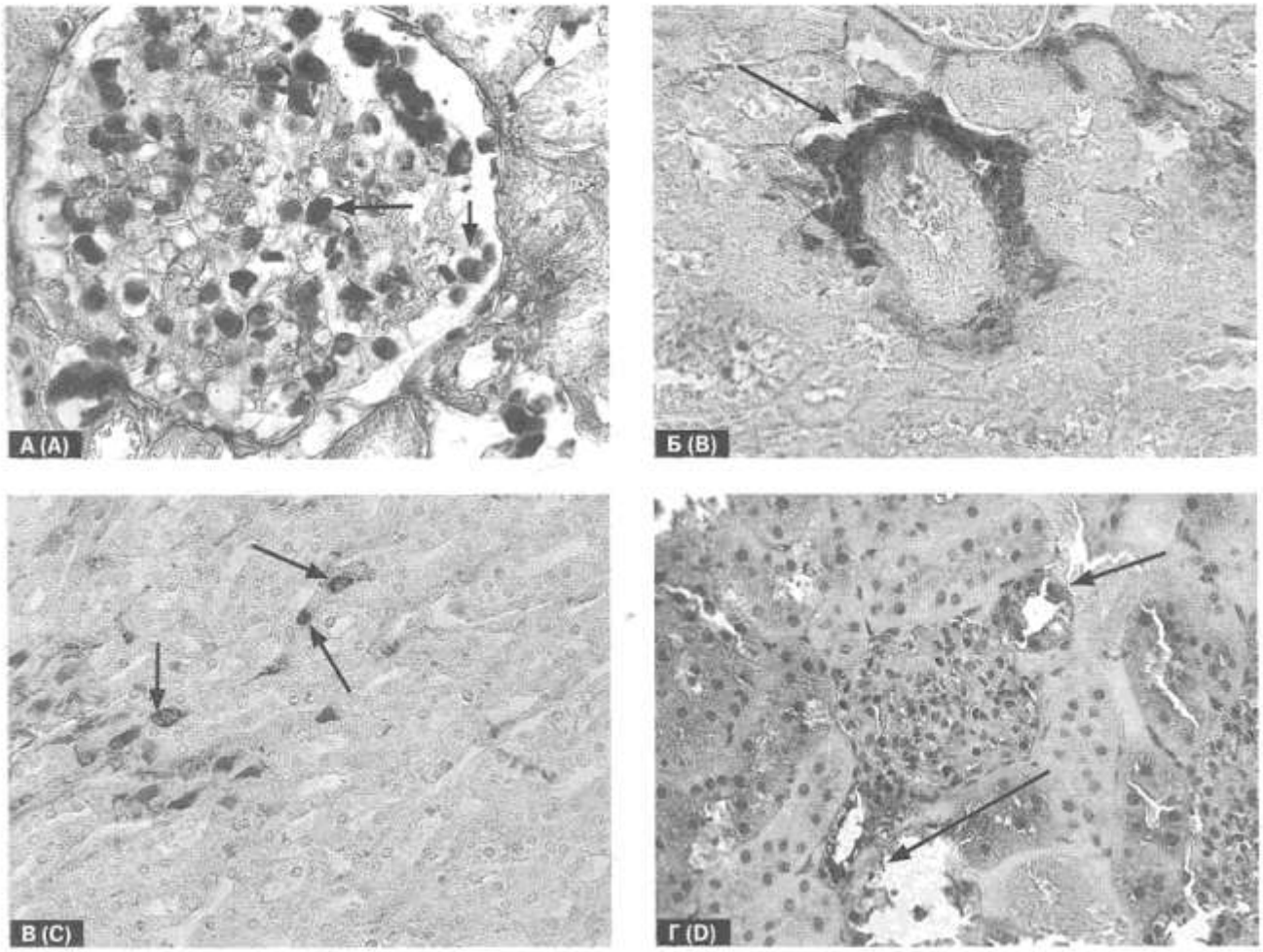


Рисунок 2. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные *Streptococcus pyogenes* типа M1

Figure 2. *Streptococcus pyogenes* type M1-induced immunomorphological changes in cortical and medullary layers of the rabbit kidneys

Примечание. А — экспрессия TNFα в мезангиальной ткани (стрелки); Б — отложение IgG в мембране проксимального канальца (стрелка); В — депозиты С3 компонента комплемента в клетках дистальных канальцев (стрелки); Г — отек и утолщение мембран проксимальных канальцев, десквамация эпителия по периферии сдавленных клубочков. А–В: иммуногистохимическая окраска, ×750; Г — окраска гематоксилин-эозином, ×500.

Note. A — glomerular mesangial cells TNFα expression (arrows); B — IgG deposition in the proximal tubule wall (arrow); C — C3 component of complement deposited in the distal tubules cells (arrows); D — atrophy of the renal glomerular tissues, the abundance of red blood cells in the cavity; A–C: immunohistochemical staining, ×750; D — stained with hematoxylin-eosin, ×550.

Они оказались способны связывать нативный IgG человека, индуцировать продукцию анти-IgG-антител против IgG человека, и вызывать иммунное воспаление ткани с последующим развитием APSGN в эксперименте [18]. Белковые препараты были выделены из СГА типа M22 и его мутантов, лишенных либо Emm, либо Mrp Fcγ-белков. Бактерии разрушали ультразвуком, дезинтеграты очищали хроматографически на колонках IgG-Sepharose 6 FF. Их вводили животным дважды внутрикожно с интервалом в 3 недели (по 0,35 мг в 0,2 мл неполного адъюванта Фрейнда; еще через 2 недели инъекцию повторяли, но без адъюванта. Результат приведен в табл. 4 и на рис. 4. Они указывают на то, что нефритогенность присуща IgGFc-связывающим белкам СГА, но не коммерческим IgGFc-белкам иного бактериального происхождения (протеины A и G) [18].

В следующих экспериментах нам удалось показать, что развитие экспериментального гломерулонефрита у кроликов можно подавить либо ослабить с помощью Fc-фрагментов IgG человека или кролика, но не Fab-фрагментов (табл. 5) [4, 18, 19].

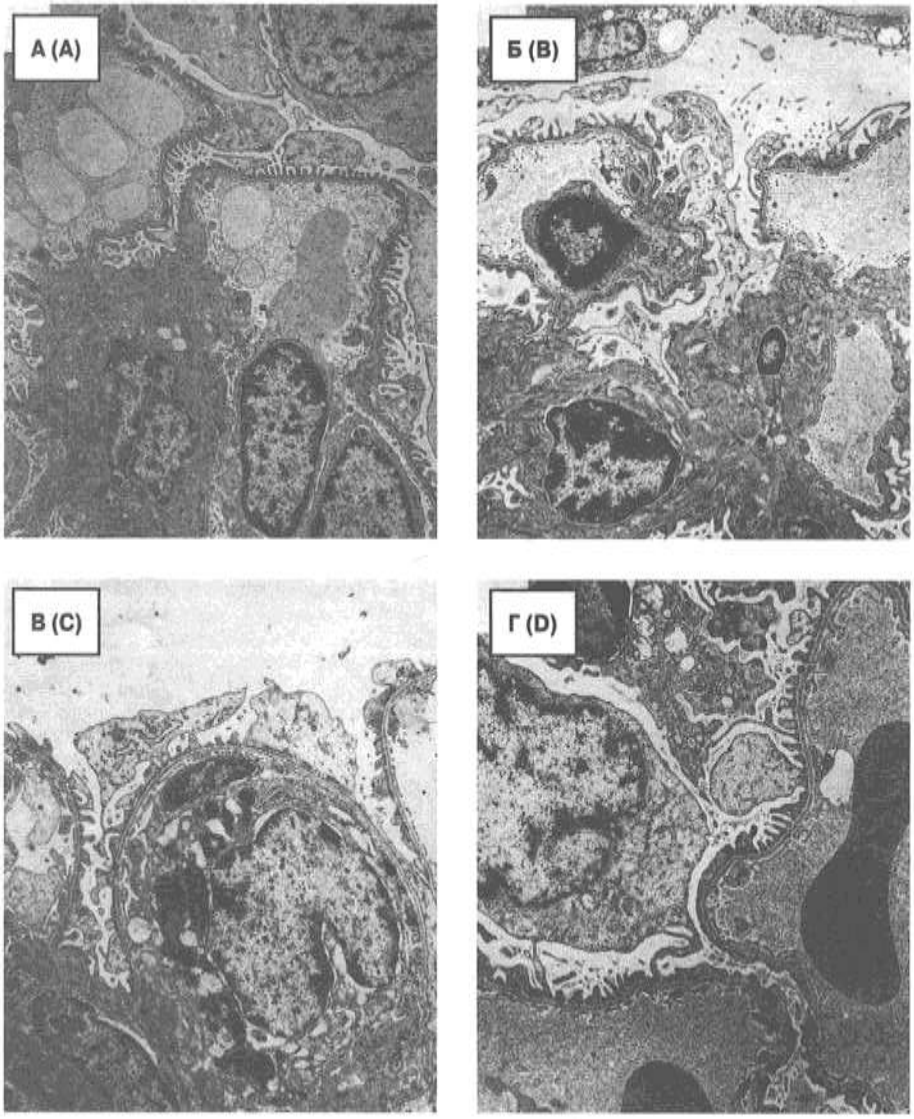


Рисунок 3. Мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит у кролика после испытания FcR-позитивного штамма типа M1

Figure 3. IgGFc-positive GAS strain type M1 inoculation elicits rabbit membranous-proliferative glomerulonephritis

Примечание. А — утолщение базальной мембраны и интерпозиция клеток мезангия, ×8000; Б — фузия подоцита и мембраны, дезинтеграция эндотелия, ×8500; В — интерпозиция мезангия и дегрануляция базофилов в капиллярах, ×8000; Г — гипертрофия и дезинтеграция подоцитов, эндотелия, обломки клеток в сосудах, ×13 500.

Note. A — thickening of the basement membrane and interposition of mesangium cells, ×8000; B — fusion of podocyte and membrane, disintegration of endothelium, ×8500; C — interposition of mesangium and intra-capillary basophil degranulation, ×8000; D — hypertrophy and disintegration of podocytes, endothelium, fragments of intra-vascular cells, ×13 500.

Теоретически допустимыми являются два пути подавления процесса в почечной ткани, а именно:

а) Fc-фрагменты IgG блокируют IgGFc-связывающую активность вводимых бактерий и, тем самым, ингибируют образование аутоантигенов и продукцию анти-IgG-аутоантител;

б) Fc-фрагменты IgG блокируют тканевые Fcγ-рецепторы, препятствуя развитию иммунного воспаления и экспрессии медиаторов воспаления.

О способности Fc-фрагмента IgG подавлять развитие экспериментального гломерулонефрита у крыс первыми сообщили испанские исследователи [37]. Данная работа имела несомненную практическую направленность. В этом плане приведенные выше эксперименты важны

Таблица 2. Патологические сдвиги в почечной ткани кроликов, вызываемые исходным штаммом СГА типа M22 (AL168) и его мутантами

Table 2. Pathological changes in rabbits caused by parenteral and mutant GAS M22 type strains

Штамм M22 и его мутанты* Parenteral and mutant* M22 strains	**Связывание IgG (%)** IgG binding (%)	**Число кроликов с гломерулонефритом/ число использованных кроликов** Number of rabbits with glomerulonephritis/total number of rabbits	**Титры антител к IgG человека после введения культур на сроках** Anti-human IgG antibody titers after GAS inoculation	
			6 недель 6 weeks	**8 недель** 8 weeks
mrp+emm+	34,0	4/4	1:160	1:160–1:320
mrp–emm–	3,0	0/4	> 1:10	> 1:10
mrp+emm–	16,0	4/7	1:80	1:20–1:160
mrp–emm+	13,0	7/8	1:40–1:160	1:80–1:160

Примечание. **Streptococcus pyogenes* типа M22 (штамм AL168) и его изогенные мутанты по M белку были получены от профессора G. Lindahl (Department of Laboratory Medicine, Lund University, Lund, Sweden). Метод получения изогенных мутантов и их характеристика описаны в статье A. Thern с соавт. [88].

Note. **Streptococcus pyogenes* type M22 (strain AL168) and its isogenic M protein mutants were courtesy of Professor G. Lindahl (Department of Laboratory Medicine, Lund University, Lund, Sweden). A. Thern et al. described the method to obtain isogenic mutants and their characteristics [88].

Таблица 3. Способность штаммов СГА типа M12 индуцировать гломерулонефрит у кроликов

Table 3. The ability of GAS strain type M12 to induce rabbit glomerulonephritis

Штамм M12 Strain M12	**Источник штамма** Strains source	**Связывание иммунных комплексов (%)** Binding of immune complexes (%)	**Титры анти-IgG** Titers of IgG	**Депозиты IgG и C3** IgG & C3 deposits	**Продукция TNFα, IL-6, IL-1β** Production of TNFα, IL-6, IL-1β	**Развитие гломерулонефрита** Development of APSGN
1800	**Референс** Reference	43,5%	1:320	+	+	+
257	**Клинический** Clinical	37,4%	1:160	+	+	+
305	**Клинический** Clinical	5,7%	< 1:10	–	–	–

Таблица 4. Действие очищенных IgGFc-связывающих белковых препаратов СГА на гломерулы почки иммунизированных кроликов

Table 4. The effect of purified IgG Fc-binding proteins of GAS on kidney glomeruli of immunized rabbits

IgGFc-связывающие белки IgGFc-binding proteins	**Титры анти-IgG антител** Titers of anti-IgG Abs	**Депозиты C3 и IgG** C3 and IgG deposits	**Провоспалительные цитокины** Production of proinflammatory cytokines			**Число кроликов с APSGN/ число использованных кроликов** Number of rabbits with APSGN/ total number of rabbits
			IL-1β	**IL-6**	**TNFα**	
Emm	1:20–1:80	+	+	+	+	2/3
Mrp	1:40–1:80	+	+	+	+	2/4
Emm+Mrp+	1:160–1:320	+	+	+	+	3/3
Protein A	1:10–1:20	–	–	–	–	0/3
Protein G	1:10–1:40	–	–	–	–	0/3

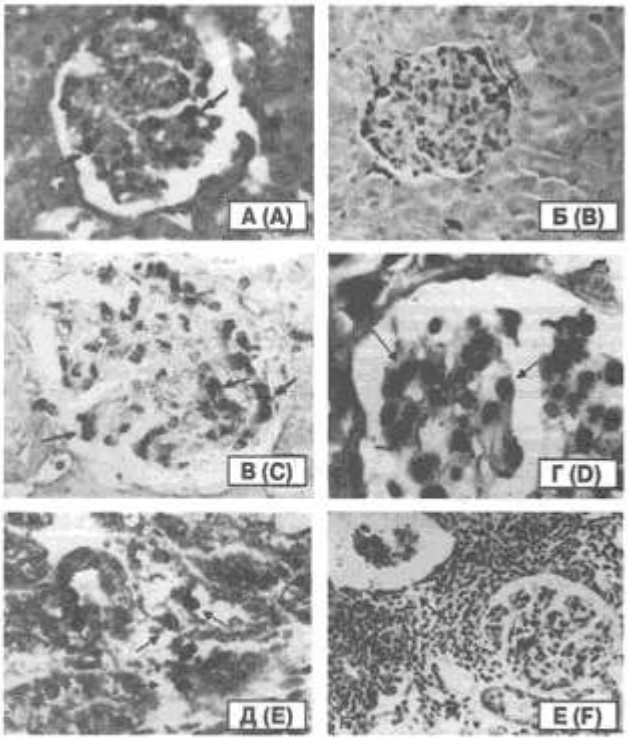


Рисунок 4. Изменения в гломерулах кроликов, вызванные очищенными Fcγ-связывающими белками (Emm+Mrp+), выделенными из *Streptococcus pyogenes* M22, штамма AL168

Figure 4. Altered rabbit glomeruli induced by purified Fcγ-binding proteins (Emm+Mrp+) isolated from *Streptococcus pyogenes* M22 (strain AL168)

Примечание. А — депозиция IgG; ×850; Б — Экспрессия TNFα, ×650; В — синтез IL-6, ×850; Г — синтез IL-1β; ×850; Д — депозиция С3-комплемента в интерстициальной зоне гломерул, ×850; Е — склероз и атрофия капилляров; окраска гематоксилин-эозином, ×450.

Note. A — IgG deposits; ×850; B — TNFα expression, ×650; C — IL-6 synthesis, ×850; D — IL-1β synthesis; ×850; E — C3 complement deposited in the interstitial zone of glomeruli, ×850; F — sclerosis and capillary atrophy; stained with hematoxylin-eosin, ×450.

в связи с возможностью использования препаратов IgG и его Fc-фрагмента с целью профилактики APSGN при СГА-инфекции, а также служат еще одним доказательством роли Fcγ-связывающих М-белков в патогенезе PSGN. Дополнительно необходимо изучить механизм данного эффекта Fc-фрагментов IgG и ответить на вопрос: могут ли они конкурировать с бактериальными и тканевыми Fcγ-рецепторами.

Следует обратить также особое внимание на предлагаемую специалистами возможность использования стрептококковых IgG-деградирующих ферментовt IdeS и EndoS в терапевтических целях для разрушения циркулирующих аутоантител при почечной патологии [82, 83, 90].

Таблица 5. Ингибирующий эффект Fc-фрагментов IgG на развитие гломерулонефрита

Table 5. Inhibitory effect of IgG Fc fragments on developing of glomerulonephritis

Штамм СГА Strain of GAS	**Фрагмент IgG** Fragment of IgG	**Число кроликов с гломерулонефритом/ число использованных кроликов** Number of rabbits with glomerulonephritis/total number of rabbits
M1/40–58	**IgG Fc человека** Fc-fragment of human IgG	0/4
	IgG Fc кролика Fc-fragment of rabbit IgG	1/10
	IgG Fab кролика Fab-fragment of rabbit IgG	4/5
	PBS (контроль) PBS (Control)	5/5

Результаты опытов, в которых сопоставлялась активность штаммов генотипа *emm*12, выделенных от больных скарлатиной и APSGN, с активностью «носительских» штаммов того же генотипа, показали, что первые в отличие от вторых связывали иммунные комплексы, то есть обладая Fcγ-рецепторами, индуцировали анти-IgG-антитела и формирование очагов иммунного воспаления, и в итоге приводили к мезангиально-пролиферативному гломерулонефриту.

Сравнительное изучение нефритогенности штаммов СГА, выделенных от больных и от носителей, было продолжено и позволило дать им оценку на примере не только штаммов генотипа *emm*12, но и генотипа *emm*1, связывающих IgG человека и кролика. При испытании 18 штаммов СГА М-типов 1 и 12, выделенных от больных, с использованием морфометрического анализа получены следующие усредненные результаты. Все штаммы связывали мономерный IgG либо искусственные иммунные комплексы в пределах 30–40%, индуцировали синтез анти-IgG-антител к IgG человека и образование иммунных комплексов, депозицию IgG и С3-комплемента, а также продукцию провоспалительных цитокинов. Штаммы от носителей подобных изменений в ткани не вызывали. Сам процесс в почках оценивали как мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит [5].

В данной работе мы поначалу столкнулись с трудно объяснимым явлением — некоторые

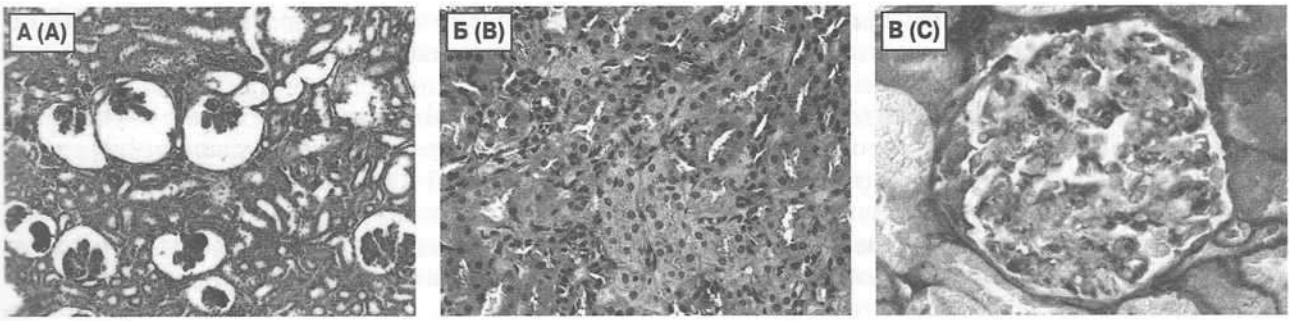


Рисунок 5. Гистологические изменения, обнаруженные в почке кролика после инъекции рекомбинантного Fcγ-белка из штамма *Streptococcus pyogenes* генотипа *emm*12

Figure 5. Histological changes detected in rabbit kidney after injection with recombinant Fcγ-protein derived from the GAS strain genotype *emm*12

Примечание. А — в корковом слое видны патологически измененные клубочки, полости капсулы расширены или сдавлены, некроз и атрофия в капиллярных петлях: деструкция наблюдается в проксимальных канальцах; Б — стенка канальцев утолщена и отечна или атрофична; эпителиальные клетки просвета канальцев с признаками некроза; в просветах обнаруживаются белковые массы; В — лимфоцитарные инфильтраты; в них преобладают мелкие и средние лимфоциты, незрелые и зрелые плазматические клетки. А, Б — окрашивание гематоксилин-эозином, А — ×250; Б — ×500; В — иммуногистохимическое окрашивание, ×750.

Note. A — pathologically altered glomeruli are visible in the cortical layer, capsule cavities are expanded or compressed, necrosis and atrophy in capillary loops, destruction in the proximal tubules is observed; B — the tubule wall is thickened and edematous or atrophic. Epithelial cells of the tubular lumen with signs of necrosis; protein masses are detected; C — lymphocytic infiltrates are detected dominated by small- and medium-sized lymphocytes, immature and mature plasma cells. A, B — stained with hematoxylin-eosin, A — ×250; B — ×500; C — immunohistochemical staining, ×750.

штаммы *emm*-генотипов 1 и 12, выделенные от здоровых лиц, не были способны связывать ни мономерный IgG, ни иммунные комплексы, хотя и содержали гены IgGFcR-белков. Возможное объяснение этому было найдено в литературе [35]. Авторы описали носительство СГА, имеющих делецию в регуляторном гене Mga-регулона, в связи с чем они были лишены способности синтезировать М-белки, а, следовательно, и IgGFc-связывающие эпитопы.

Значительный интерес представляет результат эксперимента по индукции гломерулонефрита у кроликов посредством препарата рекомбинантного Fcγ-белка СГА. Для его получения в качестве донора *emm*-гена был выбран штамм 1800 генотипа *emm*12, как наиболее стабильный по связыванию иммунных комплексов, индукции анти-IgG-антител и признакам поражения почечной ткани. Генетический материал был клонирован в плазмидном векторе pQE30 и трансформирован в штамм *E. coli*. Очищенный на колонке с Ni-Sepharose рекомбинантный белок был введен трем кроликам. Из трех подопытных животных выраженные признаки поражения в корковом и медуллярном слоях почек наблюдались у одного кролика, у двух других они носили абортивный или негативный характер. Титры антител к IgG были наиболее высокими именно у кролика с экспериментальным гломерулонефритом. У этого кролика были выявлены также выраженные депозиты IgG и C3 компонента комплемента. Морфологические изменения в почечной ткани были аналогичны APSGN (рис. 5) [8]. Этот результат служит прямым доказательством роли IgGFc-рецепторных белков СГА в генезе гломерулонефрита.

Таким образом, существенным моментом инициации развития APSGN при введении животным IgGFcR-позитивных СГА оказался феномен неиммунного связывания IgG. Именно он вызывал: антигенное преобразование собственных Fc-связанных IgG животного в аутоантиген; продукцию и накопление анти-IgG-антител, специфичных к IgG человека и кролика; а также образование иммунных комплексов. Эти начальные условия явились абсолютно необходимыми или обязательными для моделирования APSGN. При этом, титры анти-IgG-антител к IgG человека могли колебаться в широком диапазоне — от 1:40 до 1:640 — независимо от присутствия анти-IgG-антител к IgG кролика. Эти рассуждения проверены путем многократного повторения опытов с разными типами СГА и разным числом штаммов разных *emm*-генотипов. В естественных условиях СГА-инфекции человека все эти процессы будут интенсивнее в силу активности размножающихся и жизнеспособных (а не убитых в эксперименте) бактерий. Очевидно, что APSGN многогранен и не ограничивается перечисленным. Для него типичны антитела против разных продуктов *Streptococcus pyogenes* самой разной функциональной направленности. Что же касается их

участия в инициации процесса, то это свойство присуще лишь антителам против аутоантигенов, входящих в состав иммунных комплексов в достаточно высокой концентрации, превышающей физиологический порог непереносимости. Мы допускаем, что масштаб начального повреждающего действия иммунных комплексов и комплемента может оказаться небольшим. Но если за этим последуют действия энзиматически активных продуктов стрептококка (SpeB, Ska) [41, 63] и «хозяина» (Pla) [86], то аутоантигенами станут белковые структуры, образующиеся в результате деструкции и дегенерации почечной ткани. В контексте этого, присутствие на бактериях IgGFc-рецепторных белков является фактором нефритогенности СГА, а анти-IgG-антитела и их иммунные комплексы, несущие по две молекулы IgG, служат его инструментом с триггерной функцией. Логика такого заключения позволяет лучше представить и понять сложную последовательность событий, ведущих к развитию патологии. Исследования, ставящие целью выявить инициирующее звено в процессе, методологически оправданы, ибо направляют мысль на поиск средств и методов терапии и профилактики, особенно когда этиопатогенез заболевания нуждается в коррекции.

На актуальность вопроса об инициирующей роли Fc-рецепции IgG в генезе APSGN также указывает работа, в которой авторы моделировали процесс на мышах путем введения им антител к базальной мембране гломерул. Для лечения мышей использовали энзимы СГА: IgG-деградирующий фермент (IdeS) и эндогликозидазу (EndoS), гидролизующие Fc-фрагменты IgG [85]. При этом снижалась реакция воспаления за счет подавления депозиции C3-комплемента и ослабления лейкоцитарной инфильтрации гломерул [90].

Установлено, что иммунизация кроликов IgGFcR-позитивными штаммами, в отличие от негативных, сопровождается высокими титрами анти-IgG-антител [14, 22, 38, 50]. Эти антитела способны к агрегации и образованию активирующих комплемент комплексов, стимулирующих выброс провоспалительных цитокинов и простагландинов. Таким недавно виделся и патогенез ревматоидного артрита [24, 62]. Он связан с отложениями ревматоидного фактора на синовиальной оболочке суставов и последующим ее воспалением, что возможно указывает на общность отдельных звеньев в развитии APSGN и ревматоидного артрита.

Можно выделить три подхода к моделированию APSGN *in vivo*:

– в первом животным вводят различными путями живые СГА; при этом идентификация действующего начала затруднена и проблему пытаются решить использованием мутантных по разным признакам линий бактерий;
– во втором — животным вводят убитые СГА, с которых предварительно удален чужеродный иммуноглобулин; при этом действующим началом могут служить лишь структурные элементы бактерий; также показано использование мутантных линий СГА;
– в третьем — животным вводят высокоочищенный микробный белок, «подозреваемый» в инициации патологического процесса.

Существуют и другие подходы. Например, гломерулонефрит индуцировали у крыс введением антител к базальной мембране гломерул (GBM) [46]. При этом цепочка реакций включала: экспрессию Fcγ-рецепторов на макрофагах; связывание анти-GBM-антител; стимуляцию лейкоцитов. В другой работе при введении анти-GBM антител APSGN у мышей развивался с участием тканевых Fcγ-рецепторов и комплемента [71]. Поражение гломерул наступает при накоплении анти-GBM-антител, что подтверждает анализ биоптатов от больных [74]. IgG откладывался на GBM в виде серповидных или сегментарных скоплений из анти-IgG-антител; вокруг депозитов отмечались признаки воспаления, отек и лимфоцитарная инфильтрация.

Работы последних лет, несмотря на условность схем моделирования, подтвердили роль IgGFc-рецепторных белков в инициации APSGN при введении животным убитых IgGFcR-позитивных СГА. Такой подход исключал из числа кандидатов в инициирующие факторы большую группу бактериальных внеклеточных агентов. Стрептокиназа и цистеиновая протеиназа исключались по этой причине, а плазминовый рецептор и белки SCM — в силу их предполагаемого присутствия в IgGFcR-негативных штаммах.

В 2016–2021 гг. были опубликованы крупные обзоры по проблеме патогенеза APSGN, в которых авторы выделили ряд перспективных направлений исследования по данной теме, среди которых упоминается и феномен стрептококковой IgGFc-рецепции [59, 75, 76]. Во втором обзоре B. Rodriguez-Iturbe [75] откровенно говорит о том, что зарубежная наука в этом вопросе упустила шанс сказать свое слово о реальном факторе нефритогенности и вызываемых им реакциях.

Заключение

В данном обзоре мы постарались подробнее остановиться на начальной стадии острого постстрептококкового гломерулонефрита, на природе его пусковых звеньев, рассчитывая

пробудить интерес к данной проблеме с целью изучения механизмов неиммунного связывания иммуноглобулинов патогенными микроорганизмами в постинфекционной патологии. Нестандартный взгляд на патогенез постинфекционных осложнений СГА-инфекции может позволить, в отличие от иных подходов, по-новому подойти к их профилактике или лечению, что подчеркнет перспективность приведенных представлений.

Данный аналитический обзор посвящен памяти нашего Научного Руководителя и Учителя, Артема Акоповича Тотоляна, ушедшего из жизни 16 марта 2023 г. Идея написать такой обзор принадлежала ему. Мы, авторы, попытались реализовать предлагаемые им теоретические обоснования механизмов развития постстрептококкового гломерулонефрита, а также выводы и заключение в виде представленного вашему вниманию обзора.

Список литературы/References

1. Бурова Л.А., Суворов А.Н., Тотолян Артем А. Белки семейства М протеинов — главные факторы патогенности Streptococcus pyogenes // Медицинский академический журнал. 2022. Т. 22, № 2. С. 37–52. [Burova L.A., Suvorov A.N., Totolian Artem A. M proteins are the major pathogenicity factors of Streptococcus pyogenes. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal (Russia), 2022, vol. 22, no. 2, pp. 37–52. (In Russ.)] doi: 10.17816/MAJ106990*
2. Бурова Л.А., Суворов А.Н., Тотолян Артем А. Streptococcus pyogenes: феномен неиммунного связывания иммуноглобулинов человека и его роль в патологии // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 2. С. 217–234. [Burova L.A., Suvorov A.N., Totolian Artem A. Streptococcus pyogenes: phenomenon of nonimmune binding of human immunoglobulins and its role in pathology. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2022, vol. 24, no. 2, pp. 217–234. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SPP-245*
3. Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В., Тотолян Артем А. Роль стрептокиназы в моделировании постстрептококкового гломерулонефрита // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 5. С. 853–864. [Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevsky P.V., Totolian Artem A. Role of streptokinase in experimental streptococcal glomerulonephritis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 853–864. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ARO-1594*
4. Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян А.А. Влияние Fc-фрагментов нормального иммуноглобулина G на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами Streptococcus pyogenes // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 55–63. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian A.A. Influence of Fc fragments of normal immunoglobulin G on the development of glomerulonephritis induced by Streptococcus pyogenes strains. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020. vol. 10, no. 1, pp. 55–63. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IOI-1226*
5. Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Кулешевич Е.В., Жарков Д.А., Schalen C., Тотолян А.А. Нефритогенная активность Streptococcus pyogenes генотипов emm1 и emm12, различающихся по источнику выделения // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 233–242. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Kuleshevich E.V., Zharkov D.A., Schalen C., Totolian A.A. Nephritogenic activity of Streptococcus pyogenes genotypes emm1 and emm12, differing by the source of isolation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2015, vol. 5, no. 3. pp. 233–242. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-233-242*
6. Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В., Селиверстова В.Г., Нагорнев В.А., Шален К., Тотолян А.А. Способность стрептококков группы А типа М12 связывать иммунные комплексы и их роль в патогенезе постстрептококкового гломерулонефрита. Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 623–630. [Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevsky P.V., Seliverstova V.G., Nagornev V.A., Schalen V.A., Totolian Artem A. Capacity of group A (type M12) streptococci to bind immune complexes and their role in pathogenesis of post- streptococcal glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2006, vol. 8, no. 5–6, pp. 623–630. (In Russ.)]*
7. Нефрология: руководство для врачей: в 2 томах / Под ред. И.Е. Тареевой. М.: Медицина, 1995. [Nephrology: a guide for physicians: in 2 vol. Ed. Tareeva I.E. *Moscow: Meditsina, 1995. (In Russ.)]*
8. Тотолян Артем А., Бурова Л.А., Пигаревский П.В. Экспериментальный постстрептококковый гломерулонефрит. Санкт-Петербург: Издательство «Человек», 2019. 108 с. [Totolian Artem A., Burova L.A., Pigarevsky P.V. Experimental post-streptococcal glomerulonephritis. *St. Petersburg: Publishing House "Chelovek", 2019. 108 p. (In Russ.)]*
9. Тотолян А.А., Бурова Л.А. Fc-рецепторные белки Streptococcus pyogenes и патогенез постинфекционных осложнений (критический обзор) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 78–90. [Totolian A.A., Burova L.A. Fc-receptor proteins of Streptococcus pyogenes and pathogenesis of post-infection complications. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2014, no. 3, pp. 78–90. (In Russ.)]*
10. Тотолян А.А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В. Анализ механизмов развития иммунопатологического постстрептококкового гломерулонефрита (APSGN) // Терапевтический архив. 2008. № 6. С. 90–95. [Totolian A.A., Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevsky P.V. Analysis of mechanisms of development of immunopathological post-streptococcal glomerulonephritis (APSGN). *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive, 2008, no. 6, pp. 90–95. (In Russ.)]*
11. Abul K.A., Lichtman A., Pillai S. Cellular and molecular immunology: 9th edition. *Elsevier, 2018. 608 p.*
12. Almroth G., Lindell A., Aselius H., Sörén L., Svensson L., Hultman P., Eribe E.R., Olsen I. Acute glomerulonephritis associated with Streptococcus pyogenes with concomitant spread of Streptococcus constellatus in four rural families. *Ups. J. Med. Sci., 2005, vol. 110, no. 3, pp. 217–231. doi: 10.3109/2000-1967-067*

13. Balter S., Benin A., Pinto S.W., Teixeira L.M., Alvim G.G., Luna E., Jackson D., LaClaire L., Elliott J., Facklam R., Schuchat A. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. *Lancet, 2000, vol. 355, no. 9217, pp. 1776–1780. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02265-0*
14. Barabas A.Z., Cole C.D., Lafreniere R., Weir D.M. Immunopathological events initiated and maintained by pathogenic IgG autoantibodies in an experimental autoimmune kidney disease. *Autoimmunity, 2012, vol. 45, no. 7, pp. 495–509. doi: 10.3.109/08 9.934.2012.70281216*
15. Barnham M., Thornton T.J., Lange K. Nephritis caused by Streptococcus zooepidemicus (Lancefield group C). *Lancet, 1983, no. 1, pp. 945–948. doi: 10.1016/s0140-6736(83)92078-0*
16. Batsford S.R., Mezzano S., Mihatsch M., Schiltz E., Rodríguez-Iturbe B. Is the nephritogenic antigen in post-streptococcal glomerulonephritis pyrogenic exotoxin B (SPE B) or GAPDH? *Kidney Int., 2005, vol. 68, no. 3, pp. 1120–1129. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00504.x*
17. Burova L., Pigarevsky P., Duplik N., Snegova V., Suvorov A., Schalen C., Totolian A. Immune complex binding Streptococcus pyogenes type M12/emm12 in experimental glomerulonephritis. *JMM, 2013, vol. 62, pt 9, pp. 1272–1280. doi: 10.1099/jmm.0.059.196-0*
18. Burova L.A., Pigarevsky P.V., Seliverstova V.G., Gupalova T.V., Schalen C., Totolian A.A. Experimental poststreptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc-fragment. *APMIS, 2012, vol. 120, pp. 359–362. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02826.x*
19. Burova L A., Gavrilova E.A., Gupalova T.V., Pigarevsky P.V., Nagornev V.A., Grubb R., Schalen C., Totolian A.A. Inhibition of experimental post-streptococcal glomerulonephritis in rabbits by IgG Fc fragments. In: Streptococci — new insights into an old enemy. Ed. Sriprakash K.S. *Elsevier B.V., ICS, 2006, vol. 1289, pp. 359–362.*
20. Burova L., Thern A., Pigarevsky P., Gladilina M., Seliverstova V., Gavrilova E., Nagornev V., Schalén C., Totolian A. Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit. *APMIS, 2003, vol. 111, pp. 955–962. doi: 10.1034/j.1600- 0463.2003.1111007.x*
21. Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevsky P.V., Gladilina M.M., Seliverstova V.G., Schalen C., Totolian A.A. Triggering of renal tissue damage in the rabbit by IgGFc-receptor positive group A streptococci. *APMIS, 1998, vol. 106, pp. 277–287. doi: 10.1111/j.1699-0463.1998.tb01347.x*
22. Burova L.A., Schalen C., Koroleva I.V., Svensson M.-L. Role of group A streptococcal IgG Fc-receptor in induction of anti-IgG by immunization in rabbit. *FEMS Microbiol. Immunol., 1989, vol. 47, pp. 443–448. doi: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb02435.x*
23. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis., 2005, vol. 5, no. 11, pp. 685–694. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70267-X*
24. Christensen P., Schroder A.R., Possible role of microbial IgGFc-binding proteins in rheumatoid arthritis. *Agents Actions, 1990, vol. 29, no. 1–2, pp. 88–94. doi: 10.1007/BF01964728*
25. Christensen P., Sramec J., Zatterstrom U. Binding of aggregated IgG in the presence of fresh serum: strong association with type 12 group A streptococci. Absence of binding among nephritogenic type 49 strains. *APMIS, 1981, vol. 89, no. 2, pp. 87–91. doi: 10.1111/j.1699-0463.1981.tb00158_89b.x*
26. Christensen P., Schalen C., Holm S.E. Reevaluation experiments intended to demonstrate immunological cross-reactions between mammalian tissues and streptococci. *Prog. Allergy, 1979, vol. 26, pp. 1–41. doi: 10.1159/000314455*
27. Christensen P., Oxelius V.-A. A reaction between some streptococci and IgA myeloma proteins. *Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. C, 1975, vol. 83, pp. 184–188.*
28. Collin M., Olsén A. Effect of SpeB and EndoS from Streptococcus pyogenes on human immunoglobulins. *Infect. Immun., 2001, vol. 69, no. 11, pp. 7187–7189. doi: 10.1128/IAI.69.11.7187-7189.2001*
29. Collin M., Olsén A. EndoS, a novel secreted protein from Streptococcus pyogenes with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J., 2001, vol. 20, no. 12, pp. 3046–3055. doi: 10.1093/emboj/20.12.3046*
30. Cu G.A., Mezanno S., Bannan J.D., Zabriskie J.B. Immunohistochemical and serological evidence for the role of streptococcal proteinase in acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int., 1998, vol. 54, no. 3, pp. 819–826. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00052.x*
31. Cunningham M.W. Molecular mimicry, autoimmunity, and infection: the cross-reactive antigens of group A Streptococci and their sequelae. *Microbiol. Spectr., 2019, vol. 7, no. 4: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0045-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0045-2018*
32. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev., 2000, vol. 13, no. 3, pp. 470–511. doi: 10.1128/cmr.13.3.470-511.2000*
33. Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., Lovgren M., Martin D., Schwartz B., Totolian A., Bessen D., Hollingshead S., Rubin F., Scott J., Tyrrell G.. emm typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg. Infect. Dis., 1999, no. 5, pp. 247–253. doi: 10.3201/eid0502.990209*
34. Fitzsimons E.J., Lange C.F. Hybridomas to specific streptococcal antigen induce tissue pathology in vivo; autoimmune mechanisms for post-streptococcal sequelae. *Autoimmunity, 1991, vol. 10, no. 2, pp. 115–124. doi: 10.3109/08916939109004815*
35. Flores A.R., Olsen R.J., Wunsche A., Kumaraswami M., Shelburne S.A., Carroll R.K., Musser J.M. Natural variation in the promoter of the gene encoding the Mga regulator alters host-pathogen interaction in group A Streptococcus carrier strains. *Infect. Immun., 2013, vol., 81, no. 11, pp. 4128–4138. doi: 10.1128/IAI.00405-13*
36. Forsgren A., Sjoquist J. "Protein A" from S. aureus. I. Pseudoimmune reaction with human gamma-globulin. *J. Immunol., 1966, vol. 97, no. 6, pp. 822–827.*
37. Gomes-Guerrero C., Duque N., Casado M.T., Pastor C., Blanco J., Mampaso F., Vivanco F., Egido J. Administration of IgGFc-fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J. Immunol., 2000, vol. 164, pp. 2091–2101. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2092*

38. Grubb R., Burova L., Hultguist R., Schalen C., Totolian A. Anti-Ig-allotypic specifities of spontaneously occurring anti-immunoglobulins. In: Antibodies- protective, destructive and regulatory role. Eds. Milgrome F., Abeyounis C., Albini B. *Basel: Karger, 1985, pp. 224–233.*
39. Haanes E.J., Heath D.G., Cleary P.P. Architecture of the vir regulons of group A streptococci parallels opacity factor phenotype and M protein class. *J. Bacteriol., 1992, vol. 174, no. 15, pp. 4967–4976. doi: 10.1128/jb.174.15.4967-4976.1992*
40. Hollingshead S.K., Readdy T.L., Yung D.L., Bessen D.E. Structural heterogeneity of the emm gene cluster in group A streptococci. *Mol. Microbiol., 1993, vol. 8, no. 4, pp. 707–717. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01614.x*
41. Honda-Ogawa M., Ogawa T., Terao Y., Sumitomo T., Nakata M., Ikebe K., Maeda Y., Kawabata S. Cysteine proteinase from Streptococcus pyogenes enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J. Biol. Chem., 2013, vol. 288, no. 22, pp. 15854–15864. doi: 10.1074/jbc.M113.469106*
42. Johnston K.H., Chaiban J.I., Wheeler R.C. Analysis of the variable domain of the streptokinase gene from streptococci associated with poststreptococcal glomerulonephritis. *Zbl. Bact., 1992, vol. 22, pp. 339–342.*
43. Kambham N. Postinfectious glomerulonephritis. *Adv. Anat. Pathol., 2012, vol. 19, no. 5, pp. 338–347. doi: 10.1097/PAP.0b013e31826663d9*
44. Kefalides N.A., Pegg M.T., Ohno N., Poon-King T., Zabriskie J., Fillit H. Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Exp. Med., 1986, vol. 163, no. 3, pp. 588–602. doi: 10.1084/jem.163.3.588*
45. Kil K.S., Cunningham M.W., Barnett L.A. Cloning and sequence analysis of a gene encoding a 67-kilodalton myosin-cross reactive antigen of Streptococcus pyogenes reveals its similarity with class II major histocompatibility antigens. *Infect. Immun., 1994, vol. 62, no. 6, pp. 2440–2449. doi: 10.1128/iai.62.6.2440-2449.1994*
46. Kovalenko P., Fujinaka H., Yoshida Y., Kawamura H., Qu Z., El-Shemi A., Li H., Matsuki A., Bilim V., Yaoita E., Abo T., Uchiyama M., Yamamoto T. Fc receptor-mediated accumulation of macrophages in crescentic glomerulonephritis induced by antiglomerular basement membrane antibody administration in WKY rats. *Int. Immunol., 2004, vol. 16, no. 5, pp. 625–634. doi: 10.1093/ intimm/dxh058*
47. Kronvall G. A surface component in group A, C and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *J. Immunol., 1973, vol. 111, no. 5, pp. 1401–1406.*
48. Lange C.F. Tracking the in vivo localization of streptococcal cell membrane (SCM) monoclonal antibodies: potential model for post-streptococcal sequelae. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 1995, vol. 89, no. 2, pp. 241–255.*
49. Lange C.F., Esmao M.J. Epitope mapping of homologous and cross-reactive antigens by monoclonal antibodies to streptococcal cell membrane (mAb to SCM). *Mol. Immunol., 1996, vol. 33, no. 9, pp. 777–786. doi: 10.1016/0161-5890(96)00019-3*
50. Lebrun L., Pillot J., Grangeot-Keros L. Significance of anti-IgG antibodies obtained by immunization of rabbits with same streptococcal strains. *Ann. Inst. Pasteur Immunol., 1982, vol. 133, pp. 45–56.*
51. Lindahl G. An Odyssey in word of M proteins. In: Perspectives on receptins and resistance. Ed. Kronvall G. *Stockholm, 2013, pp. 13–23.*
52. Lindahl G., Akerstrom B. Receptor for IgA in group A streptococci: cloning of the gene and characterization of the protein expressed in E. coli. *Mol. Microbiol., 1989, vol. 3, no. 2, pp. 239–247. doi: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb01813.x*
53. Luo Y.H., Kuo C.F., Huang K.J., Wu J.J., Lei H.-Y., Lin M.T., Chuang W.-J., Liu C.-C., Lin C.-F., Lin Y.-S. Streptococcal pyrogenic exotoxin B antibodies in a mouse model of glomerulonephritis. *Kidney Int., 2007, vol. 72, no. 6, pp. 716–724. doi: 10.1038/sj.ki.5002407*
54. Maharaj S., Seegobin K., Chrzanowski S., Chang S. Acute glomerulonephritis secondary to Streptococcus anginosus. *BMJ Case Rep., 2018: bcr2017223314. doi: 10.1136/bcr-2017-223314*
55. Malke H. Polymorphism of the SK gene: implication for the pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis., 1993, vol. 278, pp. 3686–3693. doi: 10.1016/S0934-8840(11)80842-X*
56. McIntosh R.M., Allen J.E., Rabideua D., Carcio R., Rubio L., Rodriquez-Iturbe B. The role of interaction between streptococcal products and immunoglobulins in the pathogenesis of glomerular and vascular injure. In: Streptococcal diseases and the immune response (Eds. Read S.E., Zabriskie J.B.). *New York, London Academic Press, 1980, pp. 585–596.*
57. McIntosh R.M., Kaufman D.B., McIntosh J.R., Griswold W.R. Glomerular lesions produced in rabbits by autologous serum and autologous IgG modified by treated with a culture of a hemolytic Streptococcus. *J. Med. Microbiol., 1972, vol. 5, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1099/00222615-5-1-1*
58. McIntosh R.M., Kulvinskas C., Kaufman D.B. Alteration of the chemical composition of human immunoglobulin G by Streptococcus pyogenes. *J. Med. Microbiol., 1971, vol. 4, no. 4, pp. 535–538. doi: 10.1099/00222615-4-4-535*
59. Mills J.O., Ghosh P. Nonimmune antibody interactions of Group A Streptococcus M and M-like proteins. *PLoS Pathog., 2021, vol. 17, no. 2: e1009248. doi: 10.1371/journal. ppat.1009248 E*
60. Mosquera J., Romero M., Viera N., Rincon J., Pedreáñez A. Could streptococcal erythrogenic toxin B induce inflammation prior to the development of immune complex deposits in poststreptococcal glomerulonephritis? *Nephron Exp. Nephrol., 2007, vol. 105, no. 2, pp. e41–e44. doi: 10.1159/000097602*
61. Myhre E.B., Kronvall G. Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among gram-positive cocci. Description of three major types of receptors for human immunoglobulin G. *Infect. Immun., 1977, vol. 17, no. 3, pp. 475–482. doi: 10.1128/IAI.17.3.475-482.1977*
62. Nardella F.A., Oppliger I.R., Stone G.C., Sasso E.H., Mannik M., Sjoquist J., Schroder A.K., Christensen P., Johansson P.J., Bjork L. Fc epitopes to human RFs and the relationships of RFs to the Fc binding proteins of microorganisms. *Scand. J. Rheumatol. Suppl., 1988, vol. 75, pp. 190–198. doi: 10.3109/ 03009748809096761*
63. Nelson D.C., Garbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from Streptococcus pyogenes – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol. Chem., 2011, 392, no. 12, pp. 1077–1088. doi: 10.1515/BC.2011.208*

64. Nordenfelt P., Waldemarson S., Linder A., Morgelin M., Karlsson C., Malmstrom J., Bjorck L. Antibodies orientation at bacterial surfaces is related to invasive infection. *J. Exp. Med., 2012, vol. 209, no. 13, pp. 2367–2381. doi: 10.1084/jem.20120325*
65. Nordstrand A., McShan W.M., Ferretti J.J., Holm S.E., Norgren M. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect. Immun., 2000, vol. 68, no. 3, pp. 1019–1025. doi: 10.1128/iai.68.3.1019-1025.2000*
66. Nordstrand A., Norgren M., Ferretti J.J., Holm S.E. Streptokinase as a mediator of acute post-streptococcal glomerulonephritis in an experimental mouse model. *Infect. Immun., 1998, vol. 66, no. 1, pp. 315–321. doi: 10.1128/IAI.66.1.315-321.1998*
67. Nordstrand A., Norgren M., Holm S.E. An experimental model for acute glomerulonephritis in mice. *APMIS, 1996, vol. 104, pp. 805–816. doi: 10.1111/j.1699-0463.1996.tb04946.x*
68. Oda T., Yoshizawa N., Yamakami K., Yutaka Sakurai Y., Hanako Takechi H., Yamamoto K., Oshima N., Kumagai H. The Role of nephritis-associated plasmin receptor (NAPlr) in glomerulonephritis associated with streptococcal infection. *J. Biomed. Biotechnol., 2012: 417675. doi: 10.1155/2012/417675*
69. Oda T., Yoshizawa N., Yamakami K., Tamura K., Kuroki A., Sugisaki T., Sawanobori E., Higashida K., Ohtomo Y., Hotta O., Kumagai H. Localization of nephritis-associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Hum. Pathol., 2010, vol. 41, no. 9, pp. 1276–1285. doi: 10.1016/j.humpath.2010.02.006*
70. Okuhara K., Yoshimoto M., Fujisawa S., Watanabe Y., Okuda R. Anti-streptococcal cell membrane and anti-human glomerular basement membrane titers in sera of patient with poststreptococcal acute glomerulonephritis and anaphylactoid purpura. *Jpn Circ. J., 1983, vol. 47, no. 11, pp. 1293–1299. doi: 10.1253/jcj.47.1293*
71. Otten M.A., Groeneveld T.W. L, Flierman R., Rastaldi M.P., Trouw L.A., Faber-Krol M.C., Visser A., Essers M.C., Claassens J., Verbeek S., Cees van Kooten, Roos A., Daha M.R. Both complement and IgG Fc receptors are required for development of attenuated antiglomerular basement membrane nephritis in mice. *J. Immunol., 2009, vol. 183, no. 6, pp. 3980–3988. doi: 10.4049/jimmunol.0901301*
72. Pancholi V., Fischetti V.A. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med., 1992, vol. 176, no. 2, pp. 415–426. doi: 10.1084/jem.176.2.415*
73. Phillips J., Palmer A., Baliga R. Glomerulonephritis associated with acute pneumococcal pneumonia: a case report. *Pediatr. Nephrol., 2005, vol. 20, no. 10, pp. 1494–1495. doi: 10.1007/s00467-005-1994-6*
74. Qu Z., Cui Z., Liu G., Zhao M. The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. *BMC Immunology, 2013, vol. 14: 19. doi: 10.1186/1471-2172-14-19*
75. Rodriguez-Iturbe B. Autoimmunity in acute poststreptococcal GN: a neglected aspect of the disease. *JASN, 2021, vol. 32, pp. 534–542. doi: 10.1681/ASN.2020081228*
76. Rodriguez-Iturbe B., Haas M. Post-Streptococcal Glomerulonephritis. In: Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet]. *Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333424*
77. Rodriguez-Iturbe B., Musser J.M. The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol., 2008, vol. 19, no. 10, pp. 1855–1864. doi: 10.1681/ASN.2008010092*
78. Rukshan R.A.M., Hamlin A.S., Andronicos N.M., Lawlor C.S., McMillan D.J., Sriprakash K.S., Ketheesan N. Characterization of an experimental model to determine streptococcal M protein-induced autoimmune cardiac and neurobehavioral abnormalities. *Immunol. Cell. Biol., 2022, vol. 100, no. 8, pp. 653–666. doi: 10.1111/imcb.12571*
79. Rukshan R.A.M., Sikder S., Hamlin A.S., Andronicos N.M., McMillan D.J., Sriprakash K.S., Ketheesan N. Requirements for a robust animal model to investigate the disease mechanism of autoimmune complications associated with ARF/RHD. *Front. Cardiovasc. Med., 2021, vol. 8: 675339. doi: 10.3389/fcsm.2021.676339*
80. Schalen C., Kurl D.N., Christensen P. Independent binding of native and aggregated IgG in group A streptococci. *AMIS, 1986, vol. 94, no. 5, pp. 333–338. doi: 10.1111/j.1699-0463.1986.tb03062.x*
81. Schroder A.K., Nardella F.A., Mannik M., Johansson P.J., Christensen P. Identification of the site on IgG Fc for interaction with streptococci of groups A, C and G. *Immunology, 1987, vol. 62, no. 4, pp. 523–527.*
82. Segelmark M., Hellmark T. Anti-glomerular basement membrane disease: an update on subgroups, pathogenesis and therapies. *Nephrol. Dial. Transplant., 2019, vol. 34, no. 11, pp. 1826–1832. doi: 10.1093/ndt/gfy327*
83. Segelmark M., Björck L. Streptococcal enzymes as precision tools against pathogenic IgG autoantibodies in small vessel vasculitis. *Front. Immunol., 2019, vol. 10: 2165. doi: 10.3389/fimmu. 2019.02165*
84. Seligson G., Lange K., Majeed H.A. Deol H., Cronin W., Bovie R. Significance of endostreptosin antibody titers in poststreptococcal glomerulonephritis. *Clin. Nephrol., 1985, vol. 24, no. 2, pp. 69–75.*
85. Sjogren J., Okumura Y.M., Collin M., Nizet V., Hollands A. Study of the IgG endoglycosidase EndoS in group A streptococcal phagocyte resistance and virulence. *BMC Microbiol., 2011, vol. 11: 120. doi: 10.1186/1471-2180-11-120*
86. Sun H., Ringdahl U., Homeister J.W., Fay W.P., Engleberg N.C., Yang A.Y., Rozek L.S., Wang X., Sjöbring U., Ginsburg D. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science, New Series, 2004, vol. 305, no. 5688, pp. 1283–1286 doi: 10.1126/science.1101245*
87. Tewodros W., Nordstrand A., Kronvall G., Holm S.E., Norgren M. Streptokinase gene polymorphism in group A streptococci isolated from Ethiopian children with various disease manifestations. *Microb. Pathog., 1993, vol. 15, no. 4, pp. 303–311. doi: 10.1006/mpat.1993.1080*
88. Thern A., Wastfelt M., Lindahl G. Expression of two different antiphagocytic M-proteins by Streptococcus pyogenes of the OF+ lineage. *J. Immunol., 1998, vol. 160, no. 2, pp. 860–869.*
89. Whatmore A.M., Kehoe M.A. Horizontal gene transfer in the evolution of group A streptococcal emm-like genes: gene mosaics and variation in Vir regulons. *Mol. Microbiol., 1994, vol. 11, no. 2, pp. 363–374. doi: 10.1111/j.1365- 2958.1994.tb00316.x*

90. Yang R., Otte M.A., Hellmark T., Collin M., Bjorck L., Zhao M.-H., Daha M.R., Segelmark M. Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant., 2010, vol. 25, no. 8, pp. 2479–2486. doi: 10.1093/ndt/gfq115*
91. Yoshimoto M., Hosoi S., Fujisawa S., Sudo M., Okuda R. High level of antibodies to streptococcal cell membrane antigens specifically bound to monoclonal antibodies in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Clin. Microbiol., 1987, vol. 25, no. 4, pp. 680–688. doi: 10.1128/jcm.25.4.680-684.1987*
92. Yoshizawa N., Yamakami K., Fujino M., Oda T., Tamura K., Matsumoto K., Sugisaki T., Boyle M.D.P. Nephritis-associated plasmin receptor and acute poststreptococcal glomerulonephritis: characterization of the antigen and associated immune response. *J. Am. Soc. Nephrol., 2004, vol. 15, no. 7, pp. 1785–1793. doi: 10.1097/01.asn.0000130624.94920.6b*

Авторы:
Бурова Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Суворов А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. отделом молекулярной микробиологии ФГБУН Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Пигаревский П.В., д.б.н., руководитель отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Тотолян Артем А., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Burova L.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Suvorov A.N., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Pigarevsky P.V., DSc (Biology), Head of the Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian Artem A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.04.2023
Принята к печати 07.05.2023

Received 23.04.2023
Accepted 07.05.2023

Инфекция и иммунитет
2023. Т. 13, № 3, с. 430–438
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 430–438

ВЛИЯНИЕ ИММУНОАДЪЮВАНТНОЙ И БЕЗАДЪЮВАНТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

Е.А. Хромова[1], Н.К. Ахматова[1], М.П. Костинов[1,2], С.А. Сходова[1], В.Н. Столпникова[1], А.Е. Власенко[3], В.Б. Полищук[1], А.Д. Шмитько[1]

[1] ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия
[3] Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — Филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Резюме. Вакцинация является наиболее эффективным средством профилактики гриппа и, как следствие, снижения количества и тяжести осложнений. В настоящее время для профилактики гриппа чаще используют инактивированные сплит- и субъединичные вакцины как наиболее безопасные и способствующие образованию защитного уровня штаммоспецифических вируснейтрализующих антител к глобулярному домену белка гемагглютинина и белку нейраминидазе актуальных серотипов вируса гриппа. Известно, что не все инактивированные вакцины являются достаточно эффективными для определенных категорий привитых. Учитывая низкий индекс здоровья населения на современном этапе, возникает необходимость повышения эффективности вакцин, которые должны активировать все звенья иммунной системы. С целью усиления интенсивности синтеза специфических антител к штаммам вируса гриппа стали применяться адъювантные вакцины, которые имеют иные механизмы активации параметров гуморального и клеточного иммунитета в сравнении с безадъювантными вакцинами. Однако в соответствии с требованиями Европейского комитета иммуногенность вакцин против гриппа оценивается только по показателям гуморального иммунитета. Целью данной работы было изучение иммунофенотипа лимфоцитов 27 здоровых доноров под влиянием полимер-субъединичной вакцины (иммуноадъювантной) и безадъювантных сплит- и субъединичной вакцин против гриппа. *Материалы и методы.* Субпопуляционную структуру лимфоцитов периферической крови у здоровых женщин под воздействием вакцин против гриппа исследовали *in vitro* методом проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител (мАТ) к CD3-FITC/CD8-PE, HLA-DR-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD16/56-PE, CD3-FITC/CD20-PE, CD45-FITC/CD3-PE/CD4-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD8-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/HLA-DR-PC5, CD45FITC/CD3-PE/CD25-ECD/CD4-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD25ECD/CD4PC5/CD20-PC7, Foxp3-FITC/CD25-ECD/CD4-PC5 (Immunotech, Франция). *Результаты.* Все исследуемые вакцины против гриппа, кроме индукции гуморального иммунного ответа, активируют эффекторы клеточного иммунитета, увеличивая количество NK-клеток (CD16/56), NKT-лимфоцитов (CD3/CD16/56), В-лимфоцитов (CD45/CD20), активированных (CD3/HLA-DR) и цитотоксических (CD8/HLA-DR) Т-лимфоцитов, а также клеток с маркером ранней активации (CD45/CD25). Среди исследован-

Адрес для переписки:
Хромова Екатерина Александровна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 917-41-49.
E-mail: Kate.khromova@mail.ru

Contacts:
Ekaterina A. Khromova
105064, Russian Federation, Moscow, Malyi Kazennyi lane, 5A,
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 917-41-49.
E-mail: Kate.khromova@mail.ru

Для цитирования:
Хромова Е.А., Ахматова Н.К., Костинов М.П., Сходова С.А., Столпникова В.Н., Власенко А.Е., Полищук В.Б., Шмитько А.Д. Влияние иммуноадъювантной и безадъювантных вакцин против гриппа на иммунофенотип лимфоцитов in vitro // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 430–438. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1250

Citation:
Khromova E.A., Akhmatova N.K., Kostinov M.P., Skhodova S.A., Stolpnikova V.N., Vlasenko A.E., Polishchuk V.B., Shmitko A.D. The impact of adjuvanted and non-adjuvanted influenza vaccines on in vitro lymphocyte immunophenotype // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 430–438. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1250

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TIO-1250

ных вакцин наибольшим потенциалом в индукции клеточного ответа с включением регуляторных механизмов, предупреждающих гиперактивацию, обладает иммуноадъювантная вакцина, стимулирующая нарастание численности NK (CD16/56), NKT-клеток (CD3/CD16/56), В-лимфоцитов (CD45/CD20), активированных (CD3/HLA-DR) и цитотоксических (CD8/HLA-DR) Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток (Tregs, CD4/CD25/Foxp3. *Заключение.* Вакцинация против гриппа, кроме формирования специфических антител, оказывает транзиторное, иммуномодулирующее влияние, что наиболее выраженно при использовании иммуноадъювантой вакцины. Можно предположить, что при вакцинации лиц с дисфункциями в различных звеньях иммунной системы будет наблюдаться дополнительный профилактический эффект.

Ключевые слова: *иммуноадъювантная вакцина, безадъювантная вакцина, вакцины против гриппа, иммунофенотип лимфоцитов, клеточный иммунитет, иммуногенность вакцин.*

THE IMPACT OF ADJUVANTED AND NON-ADJUVANTED INFLUENZA VACCINES ON *IN VITRO* LYMPHOCYTE IMMUNOPHENOTYPE

Khromova E.A.[a], Akhmatova N.K.[a], Kostinov M.P.[a,b], Skhodova S.A.[a], Stolpnikova V.N.[a], Vlasenko A.E.[c], Polishchuk V.B.[a], Shmitko A.D.[a]

[a] *Scientific Research Institute of Vaccines and Sera named after I.I. Mechnikov, Moscow, Russian Federation*
[b] *First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*
[c] *Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation*

Abstract. Vaccination is the most effective method of influenza prophylaxis resulting in reduced frequency and severity of complications. Currently, for the prevention of influenza, inactivated split and subunit vaccines as the safest and promoting formation of protective level of strain-specific virus neutralizing antibodies are used. It is known that not all inactivated vaccines are effective enough for select human groups. While nowadays the level of public health is low, there is a need to improve the effectiveness of vaccines that should activate all chains of the immune system. In order to enhance intensity of influenza virus strain-specific antibody production, adjuvant vaccines exerting other mechanisms to activate humoral and cellular immunity compared to non-adjuvant vaccines have been used. The aim of the study was to examine lymphocyte immunophenotype in 27 healthy donors treated with polymer-subunit (immunoadjuvant) and non-adjuvanted split and subunit influenza vaccines. *Materials and methods.* Peripheral blood lymphocyte subpopulations were studied *in vitro* by flow cytometer FC-500 Cytomics (Beckman Coulter, USA) using FITC- and PE-labeled monoclonal antibodies (mAbs). *Results.* All examined influenza vaccines activate the effectors of cellular immunity, increasing the number of NK-cells (CD16/56), NKT-lymphocytes (CD3/CD16/56), B-lymphocytes (CD45/CD20), activated (CD3/HLA-DR) and cytotoxic (CD8/HLA-DR) T-lymphocytes, as well as cells bearing early activation marker (CD45/CD25). Among them the immunoadjuvant vaccine showed the greatest potential to induce cellular response eliciting regulatory mechanisms that prevent hyperactivation, stimulating growth of NK (CD16/56), NKT-cells (CD3/CD16/56), B-lymphocytes (CD45/CD20), activated (CD3/HLA-DR) and cytotoxic (CD8/HLA-DR) T-lymphocytes, T-regulatory cells (Tregs, CD4/CD25/Foxp3). *Conclusion.* Vaccination against influenza besides the formation of specific antibodies render a transient, immunomodulating effect that is more noticeable after immunoadjuvant vaccine. It can be assumed that vaccination of people with dysfunctions of the immune system an additional prophylactic effect will be observed.

Key words: *immunoadjuvant vaccine, non-adjuvanted vaccine, influenza vaccines, lymphocyte immunophenotype, cellular immunity, vaccine immunogenicity.*

Введение

В последнее время для профилактики гриппа чаще используют инактивированные сплит- и субъединичные вакцины как наиболее безопасные и способствующие образованию защитного уровня антител. Есть данные, что не все инактивированные вакцины являются достаточно эффективными для определенных категорий пациентов [3, 4, 5, 14, 15, 26]. Из-за непрерывного антигенного дрейфа вирусов гриппа и появления пандемического гриппа представляет большой интерес изучение вакцин против гриппа, которые вызывают более широкий защитный иммунитет. В связи с этим на пороге пандемии гриппа (2009–2010 гг.) с целью усиления интенсивности синтеза специфических антител стали применять адъювантные вакцины [1, 6, 7, 8, 10]. Несмотря на то что многие из разработанных вакцин с адъювантами как в России, так за рубежом продолжают оставаться «макетами» для пандемических вакцин, некоторые применяются по настоящее время. Примером может служить полимер-субъединичная вакцина против гриппа с доказанной эпидемиологической эффективностью. Иммуногенность и безопасность данного препарата изучалась среди всех групп риска по инфицированию гриппом, особенно

у беременных, что отражено в многочисленных публикациях [9, 14, 27, 28, 29]. Однако исследований, посвященных изучению механизмов влияния адъювантных вакцин на параметры клеточного звена иммунитета и активацию не только адаптивного, но и врожденного иммунитета у людей, недостаточно [22, 23]. Кроме того, в последние 15–20 лет в России применяется и иной способ усиления эффективности вакцинации, при котором назначается до или после прививки один из иммунокорректоров, в результате чего усиливается синтез специфических антител в короткие сроки, что приводит к значительному снижению частоты респираторных инфекций в поствакцинальный период [13, 16, 17, 20, 21, 24]. Тем не менее, такой способ профилактики применяется индивидуально только для пациентов, имеющих различные отклонения в состоянии здоровья. Иммунотропные препараты, также, как и антивирусные средства, не специфичны в отношении вируса гриппа, в связи с чем вакцинация пока считается безальтернативным методом защиты от инфекции [2, 12].

Важным моментом, который остается открытым для дискуссии, является то, по каким критериям должна оцениваться не только иммуногенность, но и безопасность адъювантных вакцин. В соответствии с требованиями Европейского комитета иммуногенность вакцин против гриппа оценивается по критериям, характеризующим только гуморальный иммунитет [32]. Это не является вполне применимым для вакцин нового типа — адъювантных — с иными механизмами активации адаптивного иммунитета. Возможно, что активация параметров клеточного иммунитета, важная в формировании иммунологической памяти, будет иной, чем при использовании безадъювантных вакцин.

Целью исследования явилось изучение иммунофенотипа лимфоцитов здоровых доноров под влиянием иммуноадъювантной и безадъювантных вакцин против гриппа.

Материалы и методы

Клиническая характеристика пациентов. В одноцентровом, открытом, нерандомизированном исследовании приняли участие 27 здоровых женщин детородного возраста (18–40 лет) без сопутствующей патологии, которые в предыдущем сезоне не были вакцинированы против гриппа и не болели в течение последних 6 месяцев гриппом и гриппоподобными заболеваниями.

Правовая основа исследования. После подписания информированного согласия об участии в исследовании, согласно протоколу исследования, утвержденному на заседании этического комитета ФГБНУ НИИ ВС им. Мечникова (Москва) в 2015 г., у добровольцев были взяты образцы венозной крови с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Исследование проводилось в аккредитованной лаборатории ФГБНУ НИИ ВС им. Мечникова с использованием современных реактивов и оборудования.

Оценка субпопуляционной структуры лимфоцитов. Изменение субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови у здоровых женщин под воздействием вакцин против гриппа исследовали *in vitro* методом проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител (мАТ) к CD3-FITC/CD8-PE, HLA-DR-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD16/56-PE, CD3-FITC/CD20-PE, CD45-FITC/CD3-PE/CD4-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD8-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/HLA-DR-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD25-ECD/CD4-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD25ECD/CD4PC5/CD20-PC7, Foxp3-FITC/CD25-ECD/CD4-PC5 (Immunotech, Франция).

Мононуклеарные лейкоциты периферической крови (МЛПК) были выделены из цельной крови в градиенте плотности фиколл-урографина (ПанЭко, Россия). 10^6 клеток в 1 мл среды RPMI-1640 с Hepes (ПанЭко, Россия), содержащей 0,1 мг/мл гентамицина сульфата (Sigma, США), глутамина (0,32 мг/мл) и 10% термоактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия), инкубировали с 10 мкл соответствующей вакцины в течение 72 ч.

Жизнеспособность клеток *in vitro* определяли с помощью окрашивания трипановым синим [19].

Клетки каждого пациента инкубировались отдельно с каждой вакциной против гриппа. Контрольный образец инкубировался без присутствия вакцины.

Исследуемые вакцины. Инфлювак — вакцина гриппозная субъединичная инактивированная, Ваксигрип — инактивированная сплит-вакцина для профилактики гриппа. Данные вакцины содержат 2 штамма вируса гриппа А по 15 мкг, один штамм вируса гриппа В — 15 мкг. Гриппол плюс — вакцина гриппозная тривалентная инактивированная полимер-субъединичная. Содержит 2 штамма вируса гриппа А, один штамм вируса гриппа В — по 5 мкг и иммуноадъювант Азоксимера бромид (Полиоксидоний) — 500 мкг. Все вакцины содержали актуальные штаммы вируса гриппа сезонов 2015–2016 и 2016–2017 гг.

Статистическая обработка данных. Для выявления различий процента клеток между экспериментальными группами применялся робастный дисперсионный анализ повторных измерений (программа R, пакет WRS2, функция rmanova) с проведением последующих попарных сравнений (программа R, пакет WRS2, функция rmmcp), коррекция достигнутого

уровня значимости осуществлялась методом Холма [30]. Коррекция на множественные сравнения (контроль false discovery rate) проводилась методом Беньямини–Хохберга [35]. Описание данных проводилось с помощью медианы и интерквартильного размаха.

Результаты и обсуждение

Перед началом работы была поставлена задача по подбору оптимальной активирующей дозы каждого вакцинного препарата для изучения влияния вакцин на субпопуляционную структуру лимфоцитов в культуре МЛПК. В культуру МЛПК (10^6 кл/мл) вносили вакцины против гриппа в дозе 5, 10, 20 мкл. Вакцины в дозе 5 мкл в недостаточной степени активировали субпопуляции лимфоцитов ($p > 0,05$ по сравнению с контролем). Доза в 10 мкл при добавлении к МЛПК всех исследуемых вакцин стимулировала изменение численности клеток с различными маркерами ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). При введении в культуру МЛПК вакцин в дозе 20 мкл изменение субпопуляционной структуры было сопоставимо по сравнению с дозой 10 мкл ($p < 0,05$). Таким образом, была подобрана активирующая доза каждого вакцинного препарата в 10 мкл.

Результаты иммунофенотипирования показали изменение числа Т-лимфоцитов ($CD45^+/CD3^+$), NK (CD3-CD16/56^+), NKT ($CD3^+CD16/56^+$) клеток, В-лимфоцитов ($CD45^+/CD20^+$), а также активированных клеток (табл., рис., II обложка).

Выявлены статистически значимые различия ($F = 12,6$, $p < 0,001$, $q = 0,001$) распределения количества Т-лимфоцитов ($CD45/CD3^+$) после инкубации в зависимости от типа вакцины. Сравнительная оценка содержания Т-лимфоцитов в группах с вакцинами показала, что статистически значимое снижение численности клеток выявлялось между контролем (79,1%) и субъединичной вакциной (69,6%) ($p = 0,008$), контролем (79,1%) и иммуноадьювантной вакциной (67,1%) ($p = 0,001$), контролем (79,1%) и сплит-вакциной (72,4%) ($p = 0,009$) (табл., рис., II обложка). Следует отметить, что все вакцины приводили к снижению числа Т-лимфоцитов (%) относительно контроля (культура без вакцины), но при этом абсолютное содержание их не менялось, что может свидетельствовать о смещении численности пула клеток за счет увеличения числа других популяций.

Активация эффекторов врожденного звена иммунной системы является ключевым моментом в реализации иммунных реакций противовирусной защиты, в результате чего запускаются триггерные механизмы адаптивного иммунитета, что является кульминационным моментов в борьбе в патогенами.

Анализ также выявил существенную разницу ($F = 89,01$, $p < 0,001$, $q < 0,001$) распределения процента естественных киллеров (NK, CD3-CD16/56^+) после инкубации клеток в зависимости от типа вакцины (табл., рис., II обложка). В целом по группам отмечалось повышение содержания численности NK-клеток с 7,2% (контроль) до 13,2% под воздействием субъединичной, до 15,7% — иммуноадъювантной и до 13,0% —сплит вакцин. Выявлены статистически значимые различия между контролем (7,2%) и субъединичной вакциной (13,2%) ($p < 0,001$), контролем (7,2%) и иммуноадъювантной вакциной (15,7%) ($p < 0,001$), контролем (7,2%) и сплит-вакциной (13%) ($p < 0,001$), субъединичной (13,2%) и иммуноадъювантной (15,7%) вакцинами ($p = 0,013$), иммуноадъювантной (15,7%) и сплит-вакциной (13%) ($p = 0,002$). Субъединичная вакцина и сплит-вакцина статистически значимо не различаются ($p = 0,94$). То есть во всех культурах отмечалось повышение численности NK-клеток при культивировании их с вакцинами против гриппа. NK-клетки являются важным компонентом врожденного иммунитета при гриппе, функцией которых является лизис инфицированных вирусами клеток и регуляция врожденного и адаптивного иммунного ответа [36].

При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови человека Азоксимера бромид, входящий в состав полимер-субъединичной вакцины, существенно повышает функциональную активность NK-клеток, их цитотоксичность по отношению к клеткам-мишеням. В исследованиях Ивановой А.С. и соавт. было показано, что функциональная активность NK-клеток увеличивалась под воздействием Азоксимера бромида практически у всех исследованных доноров, причем повышающий эффект особенно выражен у индивидуумов, у которых активность NK-клеток находилась на нижней границе нормы или была понижена [11].

В отношении содержания NKT-клеток (естественные киллерные Т-лимфоциты, $CD3^+CD16/56^+$) наблюдались следующие особенности. Выявлены статистически значимые различия ($F = 57,52$, $p < 0,001$, $q < 0,001$) распределения NKT-клеток после инкубации в зависимости от типа вакцины: между контролем (1,6%) и субъединичной вакциной (3,6%) ($p = 0,006$), контролем (1,6%) и иммуноадъювантной вакциной (7,5%) ($p < 0,001$), контролем (1,6%) и сплит-вакциной (5%) ($p < 0,001$), субъединичной (3,6%) и иммуноадъювантной (7,5%) вакцинами ($p < 0,001$), субъединичной (3,6%) и сплит-(5%) вакцинами ($p = 0,007$), иммуноадъювантной (7,5%) и сплит (5%) вакцинами ($p = 0,006$). Таким образом, субъединичная вакцина повышала численность NKT-клеток в 2,2 раза,

Таблица. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови добровольцев при инкубации клеток с вакцинами против гриппа
Table. Distribution pattern of peripheral blood lymphocyte subpopulations incubated with influenza vaccines

Субпопуляции лимфоцитов Lymphocyte subpopulations	N	**Содержание клеток в группах сравнения, % Me (LQ-UQ)** % in comparison groups — Me (LQ-UQ)				Frb	p	q
		Контроль Control (without vaccine)	**Субъединичная** Subunit	**Иммуноадъювантная** Immunoadjuvanted	**Сплит** Split-product			
Т-лимфоциты (CD45/CD3⁺) T lymphocytes (CD45/CD3⁺)	20	79,1 (71,9–83,1)	69,6 (63,2–78,8)	67,1 (65,0–70,3)	72,4 (65,6–77,4)	12,6	< 0,001	0,001
Т-хелперы (CD45/CD3/CD4⁺) Helper T cells (CD45/CD3/CD4⁺)	21	43,5 (41–49,8)	37,5 (32,7–43,8)	40,2 (31,8–46,5)	41,9 (35,6–47,7)	2,50	0,071	0,107
Цитотоксические Т-лимфоциты, CTL (CD45/CD3/CD8⁺) Cytotoxic T lymphocytes, CTL (CD45/CD3/CD8⁺)	21	23,5 (17,3–24,7)	21,2 (17,4–23,6)	22,5 (16,9–26,9)	21,5 (18,4–25,8)	0,64	0,533	0,601
Естественные киллеры, NK-клетки (CD16/56⁺) Natural killer cells, NK cells (CD16/56⁺)	24	7,2 (6,4–8,2)	13,2 (11,15–14,85)	15,7 (14,2–17,2)	13 (11,7–14,4)	89,01	< 0,001	< 0,001
Естественные киллерные Т-лимфоциты, NKT (CD3/CD16/56⁺) Natural killer T cells, NKT (CD3/CD16/56⁺)	24	1,6 (1,3–2,25)	3,6 (2,77–5,82)	7,5 (6,67–8,22)	5 (4,62–6,75)	57,52	< 0,001	0,00001
В-клетки (CD45/CD20⁺) B lymphocytes (CD45/CD20⁺)	24	8,2 (7,5–9,9)	16,36 (15,47–17,7)	20,5 (18,2–21,4)	14,1 (11,9–15,8)	96,9	< 0,001	< 0,001
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты, CTL (CD8/HLA-DR⁺) Activated cytotoxic T lymphocytes, CTL(CD8/HLA-DR⁺)	20	0,4 (0,27–0,5)	0,7 (0,3–1,2)	1,6 (1,2–2,4)	1,35 (0,48–1,97)	13,36	< 0,001	< 0,001
Активированные Т-лимфоциты (CD3/HLA-DR⁺) Activated T lymphocytes (CD3/HLA-DR⁺)	12	1,05 (0,65–1,65)	2,7 (1,87–3,37)	4,95 (3,77–7,1)	2,6 (1,9–3,57)	8,92	< 0,001	0,002
Актив. лимфоциты (CD45/CD25⁺) Activated lymphocytes (CD45/CD25⁺)	16	1,45 (1–1,77)	3,7 (2,6–4,85)	4,15 (3,2–9,0)	4,15 (3,07–5,27)	12,94	< 0,001	0,001
Т-регуляторные клетки, Tregs (CD4/CD25/Foxp3⁺) Regulatory T cells, Tregs (CD4/CD25/Foxp3⁺)	13	2,7 (1,7–2,9)	3,5 (3,2–4,9)	3,7 (3,2–5,5)	4,2 (2,2–4,5)	4,27	0,017	0,032
ИРИ (CD4/CD8) IRI (CD4/CD8)	20	1,82 (1,5–3,27)	1,85 (1,45–2,325)	1,85 (1,4–2,5)	1,65 (1,475–2,525)	1,26	0,300	0,389

Примечание. Me — медиана значений, LQ-UQ — нижний и верхний квартили. Frb — значение критерия Фишера, полученное в результате робастного дисперсионного анализа повторных измерений. p — достигнутый уровень статистической значимости. q — скорректированный на множественный сравнения уровень статистической значимости, проводился методом Беньямини–Хохберга. N — объем выборки.
Note. Me — median of values, LQ-UQ — lower and upper quartiles. Frb — Fisher criterion analysis of repeated measurements. p — achieved level of statistical significance. q — corrected for multiple comparisons of statistical significance, carried out by the Benjamin–Hochberg method. N — sample size.

иммуноадъювантная — в 4,6 раза, а сплит-вакцина — в 3,1 раза по сравнению с контролем (табл., рис., II обложка). NKT-клетки, являясь фенотипически неоднородной популяцией клеток, дублируют функции NK-клеток и служат связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом [31, 35, 37].

Нами также были выявлены статистически значимые различия ($F = 96,9$, $p < 0,001$, $q < 0,001$) распределения содержания В-лимфоцитов в культуре МЛПК ($CD45/CD20^+$) после инкубации в зависимости от типа вакцины: между контролем (8,2%) и субъединичной вакциной (16,3%) ($p < 0,001$) (повышение в 2 раза); контролем (8,2%) и иммуноадъювантной вакциной (20,5%) ($p < 0,001$) (повышение в 2,5 раза); контролем (8,2%) и сплит-вакциной (14,1%) ($p = 0,001$) (повышение в 1,7 раз); субъединичной (16,3%) и иммуноадъювантной (20,5%) вакцинами ($p = 0,001$) (повышение в 1,2 раза), субъединичной (16,3%) и сплит- вакцинами (14,1%) ($p = 0,003$) (повышение в 1,1 раз), иммуноадъювантной (20,5%) и сплит (14,1%) вакцинами ($p < 0,001$) (повышение в 1,4 раз). Таким образом, активность иммуноадъювантной вакцины была самой высокой (табл., рис., II обложка). В-клетки относятся к ключевым эффекторам адаптивного иммунитета при гриппе, так как вырабатывают вируснейтрализующие антитела к гемагглютинину (в основном на его глобулярный домен), и препятствующие его контакту с клеточными рецепторами. Кроме того, благодаря Fc-фрагменту они способствуют фагоцитозу вириона и стимуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности [39].

Исследования также выявили статистически значимые различия ($F = 13,36$, $p < 0,001$, $q < 0,001$) в распределении субпопуляций активированных цитотоксических Т-клеток ($CD8/HLA\text{-}DR^+$) после инкубации с вакцинами против гриппа в зависимости от их типа, была отмечена более высокая активность иммуноадъювантной и сплит-вакцин в отношении стимуляции численности данного типа клеток (табл., рис., II обложка). Выявлены существенные различия между контролем (0,4%) и иммуноадъювантной вакциной (1,6%) ($p < 0,001$), контролем (0,4%) и сплит-вакциной (1,3%) ($p = 0,050$), субъединичной (0,7%) и иммуноадъювантной (1,6%) вакцинами ($p = 0,002$), субъединичной (0,7%) и сплит (1,3) вакцинами ($p = 0,046$). Известно, что функции цитотоксических Т-лимфоцитов заключаются в распознавании и уничтожении клеток, зараженных вирусом гриппа. Специфические цитотоксические лимфоциты не могут предотвратить первичного инфицирования клеток вирусом, но они могут ограничить репродукцию вируса и ускорить процесс его элиминирования из организма [38].

$CD8^+$ Т-клетки способны обеспечивать гетеросубтипический иммунный ответ в отсутствии антител благодаря своей способности распознавать высококонсервативные эпитопы белков вируса гриппа, таких как NP, M1, PB1 [34].

Тип вакцины также оказывал существенное влияние на содержание популяции Т-лимфоцитов с маркером поздней активации ($CD3/HLA\text{-}DR^+$) ($F = 8,92$, $p < 0,001$, $q = 0,002$ (табл., рис., II обложка). Были выявлены статистически значимые различия между контрольной группой клеток (1%) и субъединичной вакциной (2,7%) ($p = 0,044$), контролем (1%) и иммуноадъювантной вакциной (4,9%) ($p = 0,006$), контролем (1%) и сплит-вакциной (2,6%) ($p = 0,010$), субъединичной (2,7%) и иммуноадъювантной (4,9%) вакцинами ($p = 0,015$), иммуноадъювантной (4,9%) и сплит (2,6%) вакцинами ($p = 0,044$). Известно, что HLA-DR является маркером не только поздней, но и длительной активации клеток, то есть HLA-DR-позитивные лимфоциты отражают активационное состояние клеток. Согласно современным представлениям, система HLA, обеспечивая регуляцию иммунного ответа, осуществляет такие важные функции, как взаимодействие иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужеродных клеток, запуск и реализацию иммунного ответа [25].

В отношении клеток с маркером ранней активации ($CD45/CD25^+$) нами было отмечено статистически значимое повышение их численности ($F = 12,94$, $p < 0,001$, $q = 0,001$) в зависимости от типа вакцин (табл., рис., II обложка). Все исследуемые вакцины увеличивали количество клеток с маркером ранней активации. При этом выявлены статистически значимые различия между контролем (1,4%) и субъединичной вакциной (3,7%) ($p = 0,007$), контролем (1,45%) и иммуноадъювантной вакциной (4,1%) ($p = 0,049$), контролем (1,4%) и сплит-вакциной (4,1%) ($p = 0,003$). Между собой экспериментальные группы статистически значимо также не различались. Экспрессия молекулы CD25 отражает способность клеток (лимфоцитов) к пролиферации и дифференцировке [33].

Исследования также определили статистически значимые различия ($F = 4,27$, $p = 0,017$, $q = 0,032$) в содержании Т-регуляторных клеток с фенотипом $CD4/CD25/Foxp3^+$ после инкубации МЛПК в зависимости от типа вакцины (табл., рис., II обложка): иммуноадъювантная вакцина значимо повышала численность Tregs (3,7%) в культуре МЛПК по сравнению с контролем (2,7%) (повышение в 1,4 раза) ($p = 0,005$). Остальные вакцины не оказывали существенного влияния на эти клетки. Иммунорегуляторная функция nTreg реализуется как посредством секреции цитокинов, таких как TGF-β и IL-10, так

и контактного взаимодействия с эффекторными Т-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками [12, 18]. Известно, что функция регуляторных Т-клеток заключается в предотвращении чрезмерного воспаления и в обеспечении иммунологического гомеостаза. Однако эти клетки могут также участвовать в разрешении инфекций или в иммунных реакциях после вакцинации. Нарастание численности Tregs можно объяснить иммунорегулирующим влиянием вакцины, содержащей адъювант.

Заключение

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что субъединичная, полимер-субъединичная и сплит-вакцины против гриппа, помимо индукции гуморального иммунитета также оказывают активирующее влияние на эффекторы клеточного иммунитета. Иммуноадъювантная вакцина обладает большим потенциалом в стимуляции численности NK (CD16/56), NKT-клеток (CD3/CD16/56), В-клеток (CD45/CD20), активированных (CD3/HLA-DR) и цитотоксических (CD8/HLA-DR) Т-лимфоцитов, Tregs (CD4/CD25/Foxp3) по сравнению с исследованными вакцинами. То есть под ее воздействием происходит более значимая стимуляция клеточного иммунитета с включением регуляторных механизмов, предупреждающих ее гиперактивацию. Можно предположить, что вакцинация против гриппа, кроме формирования специфических АТ, может оказать транзиторное иммуномодулирующее влияние, что положительно отражается на состоянии лиц с дисфункциями в различных звеньях иммунной системы. Как показывают длительные практические наблюдения, среди привитой когорты снижается не только заболеваемость гриппом, но и другими респираторными заболеваниями.

Список литературы/References

1. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Бондарев В.П., Волкова Р.А., Лонская Н.И., Лебединская Е.В., Медуницын Н.В., Миронов А.Н., Озерецковский Н.А., Солдатов А.А., Шевцов В.А. Вакцины с адъювантами. Доклинические исследования // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2015. № 1 (53). С. 15–20. [Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Bondarev V.P., Volkova R.A., Lonskaya N.I., Lebedinskaya E.V., Medunitsyn N.V., Mironov A.N., Ozeretskovsky N.A., Soldatov A.A., Shevtsov V.A. Vaccines with adjuvants. Preclinical studies. Biopreparaty. *Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment, 2015, no. 1 (53), pp. 15–20. (In Russ.)*]
2. Аверьянов А.В., Бабкин А.П., Барт Б.Я., Волчецкий А.Л., Минина Е.С., Козырев О.А., Костинов М.П., Петров Д.В., Селькова Е.П., Путиловский М.А., Нечаев В.Б., Эпштейн О.И., Андрианова Е.Н. Эргоферон и Осельтамивир в лечении гриппа — результаты многоцентрового сравнительного рандомизированного клинического исследования // Антибиотики и химиотерапия. 2012. Т. 57, № 7–8. С. 23–30. [Averyanov A.V., Babkin A.P., Bart B.Ya., Volchetsky A.L., Minin E.S., Kozyrev O.A., Kostinov M.P., Petrov D.V., Selkova E.P., Putilovsky M.A., Nechaev V.B., Epstein O.I., Andrianova E.N. Ergoferon and oseltamivir in the fight against influenza — the results of a multicenter comparative randomized clinical trial. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy, 2012, vol. 57, no. 7–8, pp. 23–30. (In Russ.)*]
3. Аллергология и иммунология: национальное руководство. Под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 656 с. [Allergology and immunology: national manual. Eds. R.M. Khaitov, N.I. Ilyina. *Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 656 p. (In Russ.)*]
4. Вакцинация взрослых с бронхолегочной патологией. Руководство для врачей. Под ред. М.П. Костинова. М.: Арт-студия «Созвездие», 2013. 109 с. [Vaccination of adults with bronchopulmonary pathology. Guide for doctors. Ed. M.P. Kostinov. *Moscow: Art Studio "Constellation", 2013. 109 p. (In Russ.)*]
5. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. 4-е изд. Под ред. М.П. Костинова. М.: 4Мпресс, 2013. 432 с. [Vaccination of children with impaired health. 4th ed. Ed. M.P. Kostinov. *Moscow: 4Mpress, 2013. 432 p. (In Russ.)*]
6. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Краткое издание / Под ред. В.В. Зверева, Р.М. Хаитова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Vaccines and vaccination: national leadership. Concise edition. Ed. by V.V. Zverev, R.M. Khaitov. *Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 640 p. (In Russ.)*]
7. Есмагамбетов И.Б., Алексеева С.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Современные подходы к созданию универсальной вакцины против вируса гриппа // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 117–132.]Esmagambetov I.B., Alekseeva S.V., Sayadyan K.S., Shmarov M.M. Current approaches to universal vaccine against influenza virus. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2016, vol. 6, no. 2, pp. 117–132. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-117-132*
8. Зверев В.В., Костинов М.П., Михайлова Н.А., Жирова С.Н., Миронов А.Н., Теркачева О.А., Романова А.А., Черданцев А.П. Иммуногенность вакцины гриппозной инактивированной субъединичной адсорбированной моновалентной, штамм A/California/7/2009/(H1N1) // Вопросы вирусологии. 2011. № 56 (3). С. 20–23. [Zverev V.V., Kostinov M.P., Mikhailova N.A., Zhirova S.N., Mironov A.N., Terkacheva O.A., Romanova A.A., Cherdantsev A.P. Immunogenicity of inactivated subunit adsorbed monovalent vaccine against influenza A/CALIFORNIA/7/2009 (H1N1) strain. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2011, no. 56 (3), pp. 20–23. (In Russ.)*]
9. Зверев В.В., Костинов М.П., Черданцев А.П., Кусельман А.И., Киселев О.И., Ерофеева М.К., Краснопольский В.И., Новикова С.В., Серова О.Ф., Брико Н.И., Чучалин А.Г. Вакцинация беременных против гриппа: федеральные клинические рекомендации. Н. Новгород: Ремедиум Приволжье, 2015. 42 с. [Zverev V.V., Kostinov M.P., Cherdantsev A.P., Kuselman A.I., Kiselev O.I., Erofeeva M.K., Krasnopolskiy V.I., Novikov S.V., Serova O.F., Briko N.I., Chuchalin A.G. Vaktsinatsiya beremennykh protiv grippa: federal'nye klinicheskie rekomendatsii [Vaccination of pregnant women against influenza: federal guidelines]. *N. Novgorod: Remedium Privolzhje, 2015, 42 p. (In Russ.)*]
10. Зверев В.В., Миронов А.Н., Костинов М.П., Михайлова Н.А., Жирова С.Н., Теркачева О.А., Дылдина Н.В., Романова А.А., Бушменков Д.С., Цаан А.А. Результаты клинических исследований безопасности и реактогенности

гриппозной вакцины (штамм A(H1N1)/California/7,2009) Пандефлю // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 4 (53). С. 86–90. [Zverev V.V., Mironov A.M., Kostinov M.P., Mikhailova N.A., Zhirova S.N., Terkhacheva O.A., Dyldina N.V., Romanova A.A., Bushmenkov D.S., Tsaan A.A. Results of clinical studies of vaccine safety and reactogenicity of an inactivated influenza subunit adsorbed monovalent (strain A(H1N1)/California/7/2009) Pandeflyu. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2010, no. 4 (53), pp. 86–90. (In Russ.)*]

11. Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В., Гурковская Я.И., Апрятина В.А., Пащенков М.В., Дагиль Ю.А., Мастернак Т.Б., Пинегин Б.В., Абрамова М.А. Механизмы адъювантных эффектов полиоксидония // Иммунология гемопоэза. 2015. Т. 13, № 2. С. 30–92. [Ivanova A.S., Puchkova N.G., Nekrasov A.V., Gurkovskaya Ya.I., Apryatina V.A., Pashchenkov M.V., Dagil' Yu.A., Masternak T.B., Pinegin B.V., Abramova M.A. Polyoxidonium adjuvant effect mechanisms. *Immunologiya gemopoeza = Haematopoiesis Immunology, 2015, vol. 13. no. 2, pp. 30–92. (In Russ.)*]
12. Казимирко Н.К., Акимова Е.Е., Завацкий В.Ю., Поляков А.С., Татаренко Д.П. Иммунология физиологической беременности // Молодой ученый. 2014. Т. 3, № 6. С. 132–137. Kazimirko N.K., Akimova E.E., Zavatsky V.Yu., Polyakov A.S., Tatarenko D.P. Immunology of physiological pregnancy. *Molodoi uchenyi = Young Scientist, 2014, vol. 3, no. 6, pp. 132–137. (In Russ.)*
13. Костинов М.П. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. М.: Медицина для всех, 2006. 172 с. [Kostinov M.P. Immunocorrection of the vaccination process in persons with disabilities. *Moscow: Medicina dlja vseh, 2006. 172 p. (In Russ.)*]
14. Костинов М.П., Ерофеева М.К., Харит С.М. Эффективность и безопасность вакцинопрофилактики гриппа у разных контингентов // Terra Medica. 2011. № 2 (65). С. 7–12. [Kostinov M.P., Erofeeva M.K., Kharit S.M. Efficacy and safety of influenza vaccination of different contingents. *Terra Medica, 2011, no. 2, pp. 7–11. (In Russ.)[*
15. Костинов М.П., Зверев В.В. Вакцинация против гепатита В, гриппа и краснухи взрослых пациентов с хроническими заболеваниями. М.: МДВ, 2009. 196 с. [Kostinov M.P., Zverev V.V. Vaccination against hepatitis B, influenza and rubella adult patients with chronic diseases. *Moscow: MDV. 2009. 196 p. (In Russ.)*]
16. Костинов М.П., Кулакова Н.А. Иммуномодуляции при вакцинации больных ХОБЛ. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018. 100 с. [Kostinov M.P., Kulakova N.A. Immunomodulation in vaccination of COPD patients. *Saarbrucken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018. 100 c. (In Russ.)*]
17. Костинов М.П., Соловьева И.Л. Иммуномодуляторы и вакцинация. М.: 4Мпресс, 2013. 272 с. [Kostinov M.P., Soloviev I.L. Immunomodulators and vaccination. *Moscow: 4mpress, 2013. 272 p. (In Russ.)*]
18. Костинов М.П., Хромова Е.А., Сависько А.А., Костинова А.М. Функциональные особенности иммунной системы при физиологическом течении беременности и их взаимосвязь с вакцинацией против гриппа // Consilium Medicum. 2016. Т. 18, № 6. С. 59–62. [Kostinov M.P., Khromova E.A., Savisko A.A., Kostinova A.M. Features of the immune system functioning during physiological pregnancy and their relationship with vaccination against influenza. *Consilium Medicum, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 59–62. (In Russ.)*]
19. Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В. Определение жизнеспособности клеточных культур: учебн.-метод. пособие для студентов. Нижний Новгород, 2015. 21 с. [Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Vedunova M.V. Detection of the sensitivity of cell cultures: educational and methodical manual. *Nizhny Novgorod, 2015. 21 p. (In Russ.)*]
20. Руководство по вакцинации и иммунотерапии при ЛОР-патологии. Под ред. М.П. Костинова, И.И. Абабия. М.: Группа МДВ, 2019. 448 с. [Guidelines for vaccination and immunotherapy for ENT-pathology. Eds. Kostinov M.P., Ababiy I.I. *Moscow: MDV Grup, 2019. 448 p. (In Russ.)*]
21. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. 1-е изд. Под ред. М.П. Костинова, А.Г. Чучалина. М.: ООО «АТМО», 2016. 128 с. [Guidelines to clinical immunology in respiratory medicine. 1st ed. Eds. Kostinov M.P., Chuchalin A.G. *Moscow: ATMO, 2016. 128 p. (In Russ.)*]
22. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Костинов М.П. Вакцины «Гриппол», «Ваксигрип» и «Инфлювак» — индукторы генов факторов врожденного и адаптивного иммунитета в клетках крови человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 5. С. 37–43. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Shapoval I.M., Kostinov M.P. Vaccines "Grippol", "Vaxigrip" and "Influvac" — gene inductors of factors of innate and adaptive immunity in human blood cells. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2014, no. 5, pp. 37–43. (In Russ.)*]
23. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Костинов М.П. Стимуляция экспрессии генов сигнальных рецепторов и индукция синтеза цитокинов в клетках крови человека при действии препарата «Рибонуклеат Натрия» и его комбинаций с гриппозными вакцинами in vitro // Молекулярная медицина. 2015. № 1. С. 12–17. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Shapoval I.M., Kostinov M.P. Simulation of signaling receptors gene expression and induction of synthesis of cytokines in human blood cells by drug Ribonucleat sodium and its combination with inactivated influenza vaccines. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine, 2015, no. 1, pp. 12–17. (In Russ.)*]
24. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск: УлГУ, 2006. 296 с. [Solovieva I.L., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Features of vaccination of children with changed premorbid background against hepatitis B, measles, mumps. *Ulyanovsk: UlSTU. 2006. 296 p. (In Russ.)*]
25. Хаитов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 716 с. [Khaitov R.M. Immunology. *Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 716 p. (In Russ.)*]
26. Чебыкина А.В., Костинов М.П. Поствакцинальный иммунитет против гриппа у пациентов с хронической бронхолегочной патологией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 4. С. 76–80. [Chebykina A.V., Kostinov M.P. Postvaccination immunity against influenza in patients with chronic broncho-pulmonary pathology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2011, no. 4, pp. 76–80. (In Russ.)*]
27. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И. Вакцинация беременных против гриппа и других инфекционных заболеваний. Руководство для врачей. М.: Группа МДВ, 2018. 143 с. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Vaccination of pregnant women against influenza and other infectious diseases. A guide for physicians]. *Moscow: MDV Group, 2018. 143 p. (In Russ.)*]

28. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И., Дагиль Ю.А., Сависько А.А. Поствакцинальный иммунитет к вирусу гриппа A/California/2009(H1N1)v у иммунизированных беременных // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 6. С. 527–532. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I., Dagil Y.A., Savis'ko A.A. Vaccine-challenged immune resistance toward virus A/California/2009(H1N1)v in immunized pregnant women. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2012, vol. 14, no. 6, pp. 527–532. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2012-6-527-532*
29. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И., Лютая З.А., Кутбутдинова М.Х. Анализ анте- и постнатального развития детей на фоне вакцинации беременных против гриппа // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2013. Т. 58, № 2. С. 30–34. [Cherdantsev A.P., Kostinov M.P., Kuselman A.I., Lyutaya Z.A., Kutbitdinov M.H. Analysis of anteand postnatal fetal development after influenza vaccination of pregnant women. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 30–34. (In Russ.)*]
30. Cole S.L., Ho L.P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. *Clin. Sci. (Lond.), 2017, vol. 1, no. 131 (4), pp. 269–283. doi: 10.1042/CS20160484*
31. Constantinides M.G., Bendelac A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Transcriptional. Curr. Opin. Immunol., 2013, vol. 25, pp. 161–167. doi: 10.1016/j.coi.2013.01.003*
32. CPMP: Note for guldens on harmonization of requirements for influenza vaccines. *URL: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/note-guidance-harmonisation-requirements-influenza-vaccines_en.pdf (01.07.2019)*
33. Graca L. Cobbold S.P. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med., 2002, vol. 195, no. 12, pp. 1641–1646. doi: 10.1084/jem.20012097*
34. Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M., Kedzierska K., Chen W. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses. *Immunol. Cell. Biol., 2013, vol. 91, no. 2, pp. 184–194. doi: 10.1038/icb.2012.78*
35. McDonald J.H. Handbook of biological statistics. *Baltimore. Maryland: Sparky House Publishing, 2nd ed., 2009. 313 p.*
36. Moser M. Natural killer cells. In: Fundamental immunology. Ed. W. Paul. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, pp. 395–430.*
37. Slauenwhite D., Johnston B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. *Front. Immunol., 2015, vol. 6: 255. doi: 10.3389/fimmu.2015.00255*
38. Sridhar S., Begom S., Bermingham A., Hoschler K., Adamson W., Carman W., Bean T., Barclay W., Deeks J.J., Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat. Med., 2013, vol. 19, no. 10, pp. 1305–1312. doi: 10.1038/nm.3350*
39. Xiang K., Ying G., Yan Z., Shanshan Y., Lei Z., Hongjun L., Maosheng S. Progress on adenovirus-vectored universal influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother., 2015, vol. 11. no. 5, pp. 1209–1222. doi: 10.1080/21645515.2015.1016674*

Авторы:

Хромова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Ахматова Н.К., д.м.н., научный консультант лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Костинов М.П., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Сходова С.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Столпникова В.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Власенко А.Е., к.т.н., преподаватель кафедры медицинской кибернетики и информатики Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей — Филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия;
Полищук В.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Шмитько А.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Khromova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Akhmatova N.K., DSc (Medicine), Scientific Adviser, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kostinov M.P., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Skhodova S.A., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Stolpnikova V.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Vlasenko A.E., PhD (Engineering), Lecturer of the Medical Cybernetics and Informatics Department, Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation;
Polischuk V.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Shmitko A.D., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.07.2019
Отправлена на доработку 13.02.2020
Принята к печати 22.06.2023

Received 18.07.2019
Revision received 13.02.2020
Accepted 22.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 439–445

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 439–445

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ

Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, В.Г. Авдиенко, И.В. Бочарова, В.В. Еремеев

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. Сапозины (Sap) — подгруппа гликопротеинов большого семейства сапозин-подобных белков. Сапозины образуются в кислых эндосомах путем расщепления просапозина. Сапозины участвуют в процессе презентации липидных антигенов микобактерий на молекулах CD1. Сапозин D (SapD) является наиболее распространенным сапозином в нормальных тканях, где его концентрация в три раза выше, чем у других сапозинов. SapD способствует гидролизу церамида кислой церамидазой *in vivo*, о чем свидетельствует накопление α-гидроксил-церамида в почках и мозжечке дефицитных по гену SapD мышей. Соответственно, у животных с дефицитом SapD обнаруживаются дегенерация почечных канальцев и гидронефроз, а также прогрессирующая потеря клеток Пуркинье в мозжечке, что приводит к атаксии. До настоящего времени наследственный дефицит SapD у людей не выявлен. Ранее нами было показано, что макрофаги, полученные от мышей-нокаутов по гену SAPD, подавляли рост *M. tuberculosis* слабее, чем макрофаги мышей дикого типа. Причем компенсация дефицита SapD в клетках нокаутов приводила к восстановлению их бактерицидной функции. Таким образом, SapD является важным компонентом в формировании иммунного ответа к туберкулезу. Однако неясно, как дефицит SapD влияет на формирование противотуберкулезного иммунного ответа в условиях *in vivo*. На модели экспериментальной туберкулезной инфекции мышей дикого типа и SapD-ko было показано, что через 5 недель после инфицирования микобактериальная нагрузка в легких и селезенке у SapD-ko была достоверно выше, чем у мышей дикого типа. Анализ клеточного состава легочной ткани показал, что для «наивных» SapD-ko по сравнению с мышами дикого типа характерно большее количество макрофагов. Также было показано, что через 5 недель после заражения мыши SapD-ko отличаются от мышей дикого типа более выраженной нейтрофильной инфильтрацией легочной ткани. Исследование склонности к апоптозу клеток легочной ткани мышей SapD-ko и мышей дикого типа показало, что содержание апоптотических клеток в легких мышей нокаутов по SapD через 3 недели после инфицирования достоверно выше, чем у мышей линии B6. Таким образом, дефицит SapD приводит к существенному усилению воспаления при экспериментальной туберкулезной инфекции, а также влияет на предрасположенность клеток легкого к апоптозу.

Ключевые слова: *туберкулез, M. tuberculosis, протекция, сапозин D, гликолипопротеин, лизосома.*

THE EFFECT OF SAPOSIN D ON THE ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNE RESPONSE IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yeremeev V.V.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Saposins (Sap) are a subgroup of glycoproteins belonging to the Saposin-Like Proteins family. They are generated by the proteolytic processing of the common precursor prosaposin. Saposins localize primarily in the lysosomes and

Адрес для переписки:
Шепелькова Галина Сергеевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2, ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Contacts:
Galina S. Shepelkova
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza alley, 2, Central Tuberculosis Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Для цитирования:
Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Авдиенко В.Г., Бочарова И.В., Еремеев В.В. Влияние сапозина D на течение туберкулезной инфекции у мышей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 439–445. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-2029

Citation:
Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yeremeev V.V. The effect of saposin D on the anti-tuberculosis immune response in experimental tuberculosis infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 439–445. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-2029

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TEO-2029

are required for the catabolism of glycosphingolipids. Saposins are involved in the presentation of lipid mycobacterial antigens on CD1 molecules. SapD is the most abundant saposin in normal tissues, where its concentration is three times higher than that of other saposins. SapD promotes the hydrolysis of ceramide by acid ceramidase *in vivo*, as evidenced by the accumulation of α-hydroxyl-ceramide in the kidneys and cerebellum of SapD-deficient mice. Accordingly, SapD-deficient animals show renal tubular degeneration and hydronephrosis, as well as progressive loss of Purkinje cells in the cerebellum, leading to ataxia. To date, no hereditary SapD deficiency has been identified in humans.Previously we had shown that macrophages derived from SAPD knockout mice suppress the growth of *M. tuberculosis* to a lesser extent than macrophages from wild-type mice. Moreover, compensation for the deficiency of SapD in knockout cells led to the restoration of their bactericidal function. Thus, SapD is an important component in the anti-TB immune response. However, it is not clear how SapD deficiency affects the in vivo antituberculosis immune response. In the model of experimental tuberculosis infection, it was shown that five weeks post infection the mycobacterial load in the lungs and spleens was significantly higher in SapD-ko mice than in wild-type mice. Analysis of the lung tissue cellular composition showed the differences between SapD-ko and B6 mice. Thus "naive" SapD-ko mice are characterized by a larger quantity of macrophages compared to B6 mice. It was also shown that five weeks after infection, SapD-ko mice differ from wild-type mice in a more pronounced neutrophilic infiltration of the lung tissue. A study of the propensity for apoptosis of cells in the lung tissue of SapD-ko mice showed that the content of apoptotic cells in the lungs of SapD knockout mice three weeks after infection was significantly higher than in wild-type B6 mice. Thus, SapD deficiency leads to a significant increase in inflammation during experimental tuberculosis infection, and also affects the predisposition of lung cells to apoptosis.

Key words: *tuberculosis, M. tuberculosis, influence, saposin D, glycolipoprotein, lysosome.*

Введение

На протяжении тысячелетий туберкулез (ТБ) представляет собой серьезную угрозу для человечества. При этом в 70% случаев легкие служат воротами проникновения инфекта и местом развития заболевания [19]. Этиологическим фактором туберкулеза является вирулентный и сложно устроенный бактериальный патоген — *M. tuberculosis*, способный противостоять протективному иммунному ответу хозяина и даже модифицировать его [6]. *M. tuberculosis* может годами персистировать в неактивном (дормантном) состоянии, фактически не причиняя вреда организму хозяина и не выходя за его пределы. Подобное состояние принято называть «латентной формой» инфекции. Переход бактерии из дормантного в метаболически активное состояние происходит при нарушении баланса между активностью *M. tuberculosis* и ограничительной функцией иммунной системы хозяина. Данный переход характеризуется интенсивным размножением микобактерий до нескольких миллиардов, что в конечном итоге ведет к разрушению тканей организма хозяина и, как следствие, — к диссеминации инфекции [9, 17].

Фагоцитоз — основной механизм защиты хозяина от бактериальной инфекции. «Киллинг» бактерий при фагоцитозе зависит от переноса инфекта в лизосомы, то есть слияния фагосомы с лизосомой. В полости лизосом насчитывается более 60 кислых гидролитических ферментов, основной функцией которых является расщепление макромолекул. Также данные органеллы содержат сапозин-подобные белки — белки-активаторы сфинголипидов, к которым относятся в том числе сапозины (Sap) [2, 4, 5]. В состав данного семейства входят пять сапозинов A–D и белок-активатор GM2. SapA–D образуются в лизосомах за счет протеолитического расщепления общего предшественника просапозина (pSap) [10]. Sap представляют собой небольшие, гликозилированные, термо- и кислотоустойчивые неферментативные белки, основной функцией которых является деградация сфинголипидов за счет активации специфических гидролаз [14]. Также было показано, что данные белки могут взаимодействовать с липидными лизосомальными мембранами, приводя к деградации последних [4, 8]. Sap при взаимодействии с гликопротеинами CD1 участвуют в антигенной презентации микобактериальных липидов иммунным клеткам хозяина [18].

Ранее, в экспериментах *in vitro*, нами было продемонстрировано влияние SapD на бактерицидную/бактериостатическую функцию макрофагов. Так, макрофаги SapD-дефицитных мышей в сравнении с культурой клеток мышей дикого типа менее эффективно подавляли рост *M. tuberculosis*. При этом компенсация дефицита SapD в клетках нокаутов приводила к восстановлению их бактерицидной функции [3]. То есть SapD — важный и необходимый компонент иммунного ответа при ТБ. В данной работе мы изучали влияние SapD на чувствительность мышей к экспериментальной туберкулезной инфекции.

Материалы и методы

Животные. Все эксперименты на животных были одобрены ЛЭК ФГБНУ «ЦНИИТ». В работе использовали самок мышей линий C57BL/6 (B6) и C57BL/6-SapD$^{-/-}$ (SapD-ko) из питомни-

ка ФГБНУ «ЦНИИТ». Мыши линии SapD$^{-/-}$ были любезно предоставлены профессором С. Кауфманом (Институт инфекционной биологии Макса Планка, Берлин, Германия) с одобрения Дж. Матсуды (Институт биологических наук о здоровье, Высшая школа Университета Токусимы, Токусима, Япония) [11].

Микобактериальные культуры и индукция экспериментальной туберкулезной инфекции. Для заражения животных был использован штамм H37RV Pasteur *M. tuberculosis* в фазе логарифмического роста [12]. В работе применяли модель низкодозового аэрозольного заражения (100 КОЕ/мышь).

Антигены. Растворимую фракцию ультразвукового дезинтеграта *M. tuberculosis* штамма H37RV использовали в качестве антигена во всех экспериментах [1].

Определение количества микобактерий в органах зараженных животных. Через 21 и 35 дней после инфицирования исследовали рост микобактерий в селезенке и легких экспериментальных животных. Десятикратные серийные разведения гомогенатов органов высевали на чашки Петри с твердым агаром Дюбо. На 21 день после высева на агар Дюбо проводили подсчет колоний.

Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCalibur (Beckton Dickenson, США) с использованием флуоресцентно-меченых антител FITC, PE, PerCP и APC по рекомендации фирмы-производителя (BD Pharmingen (США) и Biolegend (США)).

Определение активности каспазы-3/7 в клетках легочной ткани проводили с использованием набора Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, США). Клетки легочной ткани инкубировали с ультразвуковым дезинтегратом *M. tuberculosis.* Через 24 часа после инкубации к клеткам добавляли Caspase-Glo реагент (согласно рекомендации фирмы-производителя). Образцы инкубировали 2 часа в темноте при комнатной температуре, а затем оценивали активность каспазы-3/7 на люминометре (согласно рекомендации фирмы-производителя). В качестве контроля использовали клетки легочной ткани, не стимулированные ультразвуковым дезинтегратом *M. tuberculosis.*

Гистологические исследования. Серийные срезы легкого экспериментальных животных толщиной 8 мкм, полученные в электронном криотоме (ThermoFisher Scientific, Великобритания), фиксировали в метаноле и окрашивали гематоксилином и эозином [16].

Статистическая обработка результатов. Метод Стьюдента, корреляционный и вариационный анализ применяли для статистической обработки данных. При сравнение кривых выживания применяли тест Лог-ранка. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета программ GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

Результаты

Работу проводили на самках мышей нокаутов по SapD на основе B6. В качестве контроля использовали самок мышей линии B6 дикого типа. Мышей аэрозольно инфицировали низкой дозой *M. tuberculosis* штамма H37RV (100 КОЕ/мышь). На 21 и 35 день после заражения исследовали рост микобактерий в лег-

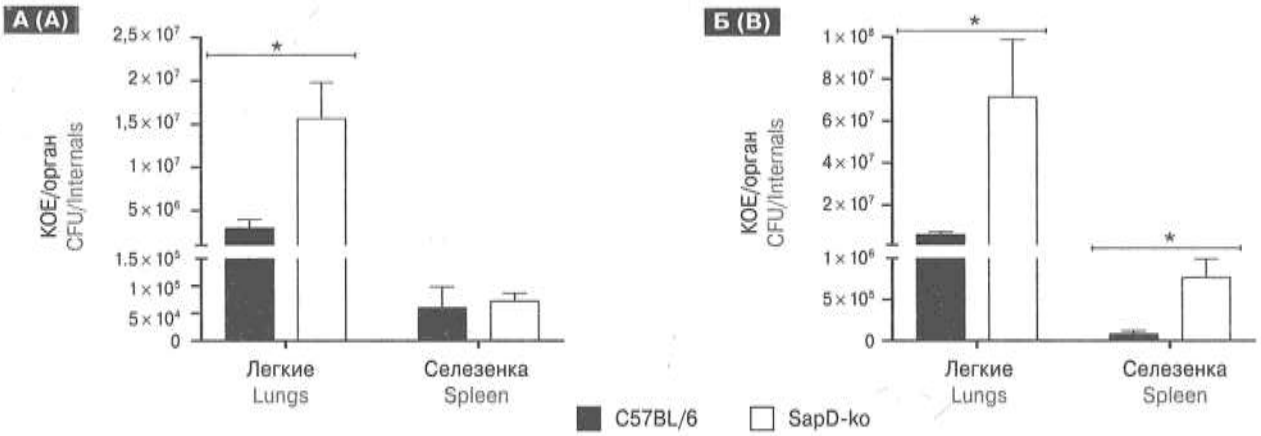


Рисунок 1. Микобактериальная нагрузка селезенки и легкого мышей B6 и SapD-ko через 21 (А) и 35 (Б) дней после аэрозольного инфицирования низкой дозой *M. tuberculosis*

Figure 1. Splenic and lung tissue mycobacterial load in B6 and SapD-ko mice at day 21 (A) and day 35 (B) post aerosol infection with a low dose of *M. tuberculosis*

Примечание. На рисунке приведены данные одного из трех идентичных экспериментов (M±SD, n = 5 в группе). * — $p < 0,05$.
Note. The data from one of three identical experiments are shown (M±SD, n = 5 per group). * — $p < 0.05$.

Рисунок 2. Различия в выживании мышей B6 (прямая линия) и SapD-ko (пунктир), инфицированных *M. tuberculosis*

Figure 2. Survival differences of B6 (straight line) and SapD-ko (dotted line) mice infected with *M. tuberculosis*

Примечание. Самки мышей линий B6 и SapD-ko (по 9 животных в группе) были аэрозольно инфицированы фильтрованной культурой *M. tuberculosis* (100 КОЕ/мышь). Выживаемость зараженных животных контролировали ежедневно на протяжении 260 дней после инфекции. На рисунке представлены данные одного из трех типовых независимых экспериментов.

Note. B6 and SapD-ko female mice (9 animals per group) were aerosolized with a filtered *M. tuberculosis* (100 CFU/mouse). The survival of infected animals was monitored daily for 260 days after infection. The data of one of three typical independent experiments are shown.

ком и селезенке (рис. 1). В легких дефицитных по SapD мышей содержалось почти на порядок больше микобактерий, чем в легких мышей дикого типа как через двадцать один, так и через тридцать пять дней после заражения (рис. 1). Данное наблюдение свидетельствует о повышенной чувствительности лишенных SapD мышей к ТБ. В то же время содержание микобактерий в селезенке зараженных животных обеих групп через 21 день после заражения не различалось (рис. 1А). Через тридцать пять дней после инфицирования уровень микобактериальной нагрузки в селезенке мышей SapD-ko был достоверно выше, чем у мышей дикого типа (рис. 1Б). По-видимому, на ранней стадии (21 день после аэрозольного заражения низкой дозой) туберкулезной инфекции дефицит SapD не сказывается на темпах диссеминации микобактерий из легких.

Остальные мыши (n = 9 в группе) были оставлены для определения динамики выживания после заражения. Как показано на рис. 2, все дефицитные по гену SapD мыши погибли к 240 дню после инфекции, в то время как все животные контрольной группы дожили до 260 дня — времени окончания эксперимента (p = 0,0057). То есть дефицит SapD снижает способность мышей противостоять туберкулезной инфекции.

Анализ инфильтрации легочной ткани мышей, аэрозольно инфицированных низкой дозой микобактерий, проводили через 21 и 35 дней после заражения. К 21 дню после инфицирования возрастает инфильтрация легочной ткани как у нокаутов по SapD, так и у мышей дикого типа (рис. 3Б, Д, III обложка). Однако, в отличие от нокаутов, у B6 происходит формирование отграниченного очага инфекции (рис. 3Б, III обложка). Данные различия становятся более очевидными на 35 день после инфицирования. Из рис. 5 видно наличие сформированного структурированного очага (гранулемы) у мышей дикого типа, в то время как у SapD-ko-животных гранулемы только формируются (рис. 3В, Е, III обложка).

Субпопуляционный анализ легочной ткани показал достоверные отличия в количестве Т-лимфоцитов $CD4^+$ между группами как у «наивных», так и у инфицированных мышей (рис. 4А). Так, через 21 день после заражения $CD4^+$ Т-клеток было достоверно больше в легких мышей B6, чем у мышей-нокаутов по SapD. Через 35 дней после инфицирования содержание $CD4^+$ Т-лимфоцитов выравнивалось (рис. 4А). В соответствии с гистологическими наблюдениями количественная оценка популяций клеток, инфильтрирующих ткань легкого, показала меньшее количество макрофагов (клетки, несущие фенотип $F4/80^+$) у неинфицированных мышей SapD-ko в сравнении с животными дикого типа (B6) (рис. 4Б). Через 21 день после заражения низкой дозой *M. tuberculosis* в легких мышей-нокаутов по SapD и мышей дикого типа определялось одинаковое количество $F4/80^+$-клеток, а через 35 дней после инфицирования количество макрофагов у SapD-ko было выше, чем у мышей дикого типа (рис. 4Б). Так же, как и при гистологическом окрашивании (рис. 3, III обложка), анализ данных, полученных методом проточной цитометрии, показал повышение нейтрофильной инфильтрации в тканях легких мышей-нокаутов по SapD по сравнению мышами B6 как через 21, так и через 35 дней после инфицирования (рис. 4В).

О содержании апоптотических клеток в легочной ткани подопытных мышей судили по уроню активности каспазы-3/7. Клетки легочной ткани интактных мышей дикого типа и SapD-ko, мышей не отличались по уровню активности каспазы-3/7. В то время как через 21 день после инфицирования активность каспазы-3/7 была достоверна выше в клетках легкого мышей-нокаутов, то есть в данной группе мышей было достоверно большее количество апоптотических клеток легкого (рис. 5).

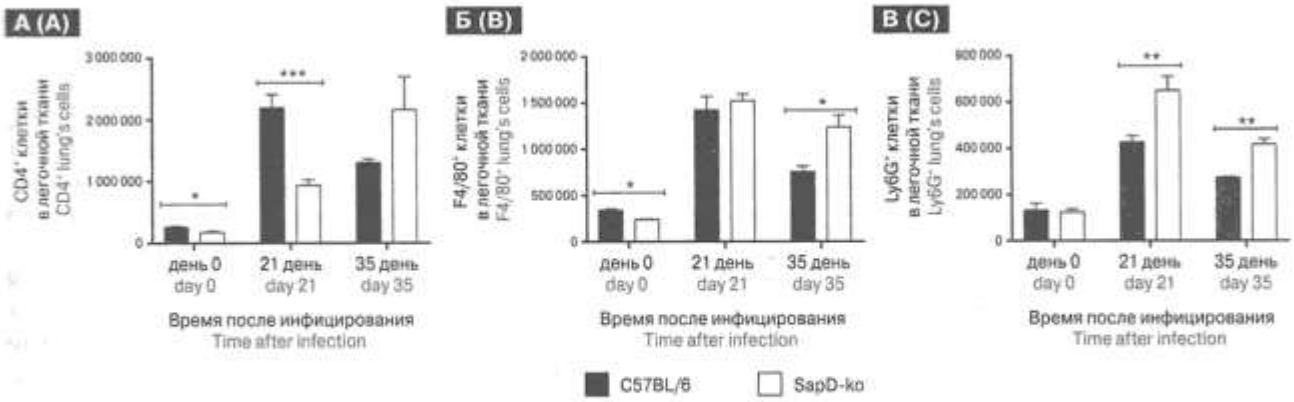


Рисунок 4. Характеристика поверхностных маркеров клеток легочной ткани SapD-ko и мышей дикого типа через 21 и 35 дней после заражения

Figure 4. Lung cell surface markers characterization of SapD-ko and wild-type mice at day 21 and day 35 post infection

Примечание. Мышей аэрозольно инфицировали вирулентным штаммом микобактерий. Клетки легкого SapD-ko- и B6-мышей выделяли на 21 и 35 днень после заражения, инкубировали с антителами CD4-PerCP (A), F4/80-PE (Б), Ly6G-FITC (B) и затем анализировали на проточном цитофлуориметре. На рисунке приведены данные одного из трех идентичных экспериментов (M±SD, n = 5 в группе). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$; *** — $p < 0,0001$.

Note. Mice were infected with a virulent mycobacterium. SapD-ko and B6 mouse lung cells were isolated at day 21 and day 35 post infection, incubated with CD4-PerCP (A), F4/80-PE (Б), Ly6G-FITC (B) antibodies and analyzed by flow cytometry. The data from one of three identical experiments are shown (M±SD, n = 5 per group). * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.001$; *** — $p < 0.0001$.

Обсуждение

SapD является наиболее распространенным сапозином в нормальных тканях, где его концентрация в три раза выше, чем у других сапозинов [13]. SapD способствует гидролизу церамида кислой церамидазой *in vivo*, о чем свидетельствует накопление α-гидроксил-церамида в почках и мозжечке мышей SapD-ko [11]. Соответственно, у животных с дефицитом SapD обнаруживаются дегенерация почечных канальцев и гидронефроз, а также прогрессирующая потеря клеток Пуркинье в мозжечке, что приводит к атаксии. До настоящего времени наследственный дефицит SapD у людей не выявлен.

Кислая среда лизосом резко увеличивает поверхностную гидрофобность SapD, тем самым позволяя положительно заряженным аминокислотам в нижней части SapD связаться с поверхностью интрализосомальных мембран, обогащенных отрицательно заряженными липидами. Затем верхняя часть SapD поворачивается на 180° вдоль своей оси, погружая таким образом его гидрофобные остатки в двуслойную мембрану и обращая положительно заряженные остатки к растворителю. Далее SapD возвращается к закрытой конформации, что формирует механистическую основу для экстирпации липидов из мембраны. В конечном итоге SapD покидает мембрану, унося связанный липид [15].

Главная функция Saps — участие в деградации сфинголипидов и мембран. Иными

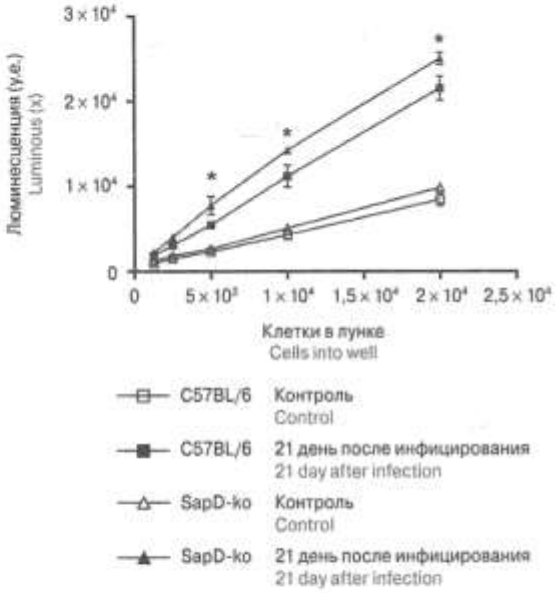


Рисунок 5. Клетки легочной ткани мышей SapD-ko сильнее подвержены апоптозу в сравнении с мышами дикого типа (по уровню активности каспазы-3/7)

Figure 5. SapD-ko mouse lung tissue cells are more prone to apoptosis compared to wild-type mice (assessed by level of caspase-3/7 activity)

Примечания. На рисунке приведены данные одного из трех идентичных экспериментов (M±SD, n = 5 в группе). * — $p < 0,05$.

Notes. The data from one of three identical experiments are shown (M±SD, n = 5 per group). * — $p < 0.05$.

словами Saps — непосредственные участники уничтожения внутриклеточных бактерий — способны бороться с микробами. Данная способность может быть ассоциирована со сдвигом катаболизма липидов либо непосредственно с бактерицидной способностью самих Saps (наши неопубликованные данные). В качестве подтверждения данной гипотезы можно рассматривать факт повышенной экспрессии SapC в казеозной туберкулеме человека [7]. В настоящей работе *in vivo*, на экспериментальной туберкулезной инфекции у мышей, была продемонстрирована повышенная чувствительность к ТБ у SapD-ko-животных в сравнении с мышами дикого типа. Так, продемонстрированы различия в бактериальной нагрузке селезенки и легочной ткани мышей SapD-ko и B6. Достоверно большее количество микобактерий высевалось из легочной ткани (через 21 и 35 дней после инфицирования *M. tuberculosis*) и селезенки (через 21 день после инфицирования) мышей SapD-ko в сравнении с группой контроля. Эти наблюдения согласуются с результатами наших предыдущих исследований о неспособности макрофагов от мышей SapD-ko эффективно подавлять микобактериальный рост в экспериментах *in vitro* [3], а также с наличием бактерицидной функции непосредственно у самого SapD (наши неопубликованные данные).

Также продемонстрированы достоверные отличия в длительности выживания инфицированных вирулентным штаммом мышей B6 и SapD-ko. Показано, что дефицит SapD снижает способность мышей противостоять ТБ инфекции. Мыши-нокауты по гену SAPD отличаются от животных дикого типа по степени образования воспалительных фокусов и по общему уровню инфильтрации в легочной ткани при экспериментальном ТБ. Так, для SapD-ko характерно достоверно большее количество макрофагов в легочной ткани на 35 день после инфицирования большее содержание $CD4^+$ Т-клеток на 21 день после заражения. Данные различия согласуются с невысокой бактерицидной и бактериостатической активностью SapD-ko-макрофагов. Продемонстрированы различия в инфильтрационном характере легочной ткани. Показано, что для мышей-нокаутов по гену SAPD характерна более сильная инфильтрация легочной ткани нейтрофилами как через 21, так и через 35 дней после инфицирования. Разница в инфильтрации видна и по образованию очагов инфекции в легких. Так, у SapD-ko, в отличие от мышей дикого типа, формирование ТБ очагов инфекции начинается через 5 недель после заражения (рис. 3В, Е, III обложка). У мышей линии B6 ТБ очаги начинают формироваться к 3 неделе после заражения, а через 35 дней после инфицирования видны четко отграниченные фокусы ТБ воспаления (рис. 3Б, Д, III обложка). Для SapD-ko-животных в сравнении с мышами линии B6 продемонстрировано достоверно большее количество апоптотических клеток в легочной ткани на 21 день после инфицирования (рис. 5). Специфический механизм действия сапозинов на интрализосомальные мембраны предположительно может быть использован для разрушения апоптотических везикул, расположенных в лизосомах, после фагоцитоза макрофагами или дендритными клетками. Возможно, фосфатидилхолин, входящий в состав мембраны апоптотических телец, осуществляет свою специфическую функцию внутри фагоцитов, а именно — выступает в роли молекулярной мишени для сапозинов в лизосомах для облегчения разрушения апоптотических пузырьков.

Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что дефицит SapD при экспериментальной туберкулезной инфекции способствует существенному усилению процессов воспаления, а также положительно влияет на предрасположенность к апоптозу клеток, инфильтрирующих легкие зараженных *M. tuberculosis* мышей.

Список литературы/References

1. Авдиенко В.Г., Бабаян С.С., Гусева А.Н. Количественные, спектральные и серодиагностические характеристики антимикобактериальных IgG-, IgM- и IgA-антител у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006. Т. 10. С. 47–55. [Avdienko V.G., Babaian S.S., Guseva A.N. Quantitative, spectral, and serodiagnostic characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Diseases, 2006, vol. 10, pp. 47–55. (In Russ.)*]
2. Еремеев В.В., Апт А.С. Сапозин-подобные белки в противоинфекционном иммунном ответе // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 597–602. [Yeremeev V.V., Apt A.S. Saposin-like proteins in anti-infectious immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 597–602. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-597-602*
3. Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Эргешов А.Э., Еремеев В.В. Влияние сапозина D на бактериостатическую функцию макрофагов при экспериментальной туберкулезной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 473–480. [Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A.E., Yeremeev V.V. Saposin D acting on macrophage bacteriostatic function in experimental tuberculosis infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 473-480. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TEO-1386*
4. Garrido-Arandia M., Cuevas-Zuviría B., Díaz-Perales A., Pacios L. A comparative study of human saposins. *Molecules, 2018, vol. 23: 422. doi: 10.3390/molecules23020422*

5. Gebai A., Gorelik A., Nagar B. Crystal structure of saposin D in an open conformation. *J. Struc. Biol., 2018, vol. 204, no. 2, pp. 145–150. doi: 10.1016/j.jsb.2018.07.011*
6. Huang L., Nazarova E.V., Russell D.G. Mycobacterium tuberculosis: bacterial fitness within the host macrophage. *Microbiol Spectr., 2019, vol. 7, no. 2: 10. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019*
7. Kim M.-J., Wainwright H., Loketz M., Bekker L.G., Walther G.B., Dittrich C., Visser A., Wang W., Hsu F.F., Wiehart U., Tsenova L., Kaplan G., Russell D.G. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol. Med., 2010, vol. 2, pp. 258–274. doi: 10.1002/emmm.201000079*
8. Kishimoto Y., Hiraiwa M., O'Brien J.S. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid. Res., 1992, vol. 33, no. 9, pp. 1255–1267.*
9. Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J. Leukoc. Biol., 2019, vol. 106, no. 2, pp. 275–282. doi: 10.1002/JLB.MR0318-095RR*
10. Kolter T., Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett., 2010, vol. 584, pp. 1700–1712. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.021*
11. Matsuda J., Kido M., Tadano-Aritomi K., Ishizuka I., Tominaga K., Toida K., Takeda E., Suzuki K., Kuroda Y. Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. *Hum. Mol. Genet., 2004, vol. 13, no. 21, pp. 2709–2723. doi: 10.1093/hmq/ddh281*
12. Nikonenko B.V., Averbakh MM Jr, Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tuber. Lung Dis., 2000, vol. 80, no. 1, pp. 15–25. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921*
13. O'Brien J.S., Kishimoto Y. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J., 1991, vol. 5, pp. 301–308. doi: 10.1096/fasebj.5.3.2001789*
14. Olmeda B., García-Álvarez B., Pérez-Gil J. Structure–function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins. *Eur. Biophys. J., 2013, vol. 42, pp. 209–222. doi: 10.1007/s00249-012-0858-9*
15. Rossmann M., Schultz-Heienbrok R., Behlke J., Remmel N., Alings C., Sandhoff K., Saenger W., Maier T. Crystal structures of human saposins C and D: implications for lipid recognition and membrane interactions. *Structure, 2008, vol. 16, pp. 809–817. doi: 10.1016/j.str.2008.02.016*
16. Shepelkova G., Evstifeev V., Majorov K., Bocharova I., Apt A. Therapeutic effect of recombinant mutated interleukin 11 in the mouse model of tuberculosis. *J. Infect. Dis., 2016, vol. 214, no. 3, pp. 496–501. doi: 10.1093/infdis/jiw176*
17. Weiss G., Schaible U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev., 2015, vol. 264, no. 1, pp. 182–203. doi: 10.1111/imr.12266*
18. Winau F., Schwierzeck V., Hurwitz R., Remmel N., Sieling P.A., Modlin R.L., Porcelli S.A., Brinkmann V., Sugita M., Sandhoff K., Kaufmann S.H., Schaible U.E. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat. Immunol., 2004, vol. 5, no. 2, pp. 169–174. doi: 10.1038/ni1035*
19. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. *URL: https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021*

Авторы:
Шепелькова Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;
Евстифеев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;
Авдиенко В.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;
Бочарова И.В., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;
Еремеев В.В., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:
Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;
Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;
Avdienko V.G., Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;
Bocharova I.V., Researcher, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;
Yeremeev V.V., DSc (Medicine), Head of the Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.09.2022
Отправлена на доработку 11.02.2023
Принята к печати 28.03.2023

Received 14.09.2022
Revision received 11.02.2023
Accepted 28.03.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 446–456

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 446–456

ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ GM-CSF *IN VITRO*

А.А. Савченко[1], Г.П. Мартынова[2], Л.А. Иккес[2], А.Г. Борисов[1], И.В. Кудрявцев[3,4], В.Д. Беленюк[1]

[1] *ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия*
[3] *ФГБНУ НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*
[4] *ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия.*

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей изменения субпопуляционного состава моноцитов и их фагоцитарной активности у детей с инфекционным мононуклеозом (ИМ) при воздействии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) *in vitro*. Обследовано 84 ребенка в возрасте от 3 до 11 лет с инфекцией вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Диагноз ВЭБ-инфекции ставился на основе клинических признаков ИМ, положительного теста на ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови и результатов ИФА-тестов (ВЭБ-VCAIgM (+), ВЭБ-EA-DIgG (+)). Контрольную группу составили 40 практически здоровых детей аналогичного возрастного диапазона. Моноциты получали стандартным методом адгезии к пластику из мононуклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности. Выделенные моноциты разделяли на две пробы: контрольная (без GM-CSF) и опытная (50 нг GM-CSF на 1 мл клеточной суспензии). Определение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов в обеих пробах осуществляли методами проточной цитометрии после инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C в CO_2-инкубаторе. Обнаружено, что у детей на фоне развития ИМ меняется субпопуляционный состав моноцитов в крови и нарушается их фагоцитарная активность. Изменения субпопуляционного состава моноцитов на фоне острого ИМ не зависели от возрастной группы детей (3–6 и 7–11 лет), характеризовались повышением количества провоспалительных (промежуточных) моноцитов и снижением содержания противовоспалительных (неклассических) моноцитов. Особенности нарушения фагоцитарной активности моноцитов у детей с ИМ зависели от возраста. У больных 3–6 лет снижена фагоцитарная активность всех субпопуляций моноцитов, тогда как у детей с ИМ 7–11 лет понижена фагоцитарная активность промежуточных и неклассических моноцитов. При воздействии GM-CSF *in vitro* на моноциты у больных ИМ независимо от возраста значительно повышается уровень противовоспалительных моноцитов,

Адрес для переписки:
Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:
Igor V. Kudryavtsev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Для цитирования:
Савченко А.А., Мартынова Г.П., Иккес Л.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Изменение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов у детей с инфекционным мононуклеозом при воздействии GM-CSF in vitro // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 446–456. doi: 10.15789/2220-7619-CII-4666

Citation:
Savchenko A.A., Martynova G.P., Ikkes L.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Belenjuk V.D. Changes in in vitro GM-CSF-exposured monocyte subset composition and phagocytic activity in children with infectious mononucleosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 446–456. doi: 10.15789/2220-7619-CII-4666

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CII-4666

в то время как фагоцитарная активность клеток меняется слабее. У детей 3–6 лет после инкубации с GM-CSF повышается фагоцитарной число для классических моноцитов, тогда как фагоцитарный индекс данной фракции моноцитов остается без изменений. У больных ИМ 7–11 лет также только у классических моноцитов повышается уровень фагоцитарного индекса. Приведенные результаты определяют научную и клиническую ценность изучения механизмов влияния GM-CSF на клетки иммунной системы и доказывают, что данный цитокин может быть использован в новой иммунотерапевтической стратегии лечения ИМ.

Ключевые слова: *инфекционный мононуклеоз, возраст детей, моноциты, субпопуляции, фагоцитарная активность.*

CHANGES IN *IN VITRO* GM-CSF-EXPOSURED MONOCYTE SUBSET COMPOSITION AND PHAGOCYTIC ACTIVITY IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Savchenko A.A.[a], Martynova G.P.[b], Ikkes L.A.[b], Borisov A.G.[a], Kudryavcev I.V.[c,d], Belenjuk V.D.[a]

[a] *Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[b] *Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[c] *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

[d] *Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation*

Abstract. The aim of the study was to investigate the features of changes in the monocytes subset composition and phagocytic activity in children with infectious mononucleosis (IM) exposed to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) *in vitro*. We examined 84 children aged 3 to 11 years with Epstein–Barr virus (EBV) infection diagnosed by clinical signs, positive EBV DNA test in blood lymphocytes and ELISA data (EBV-VCAIgM (+), EBV-EA-DIgG (+)). The control group consisted of 40 apparently healthy age-matched children. Monocytes were obtained by the standard method on adhesion to plastic from mononuclear cells isolated from heparinized venous blood by density gradient centrifugation. The isolated monocytes were divided into two samples: control (without GM-CSF) and experimental (50 ng of GM-CSF per 1 ml of cell suspension). The monocyte subset composition and phagocytic activity in both samples were measured by flow cytometry after 1-hour incubation at 37°C in a CO_2-incubator. It was found that in children with progressing IM, the blood monocyte subpopulation composition changes and their phagocytic activity is impaired. It was found that the subset composition and phagocytic activity of the blood monocytes changed in children during development of IM. Changes in the subset composition of monocytes in acute IM did not depend on the age group of children (3–6 and 7–11 years) and were characterized by increased number of pro-inflammatory (intermediate) monocytes and decreased level of anti-inflammatory (non-classical) monocytes. Features of altered monocyte phagocytic activity in children with IM depended on age. The phagocytic activity of all three monocyte subsets was reduced in children with IM 3–6 years old while children with IM 7–11 years old had reduced phagocytic activity only in intermediate and non-classical monocytes. The effect of GM-CSF *in vitro* on monocytes in patients with IM, regardless of the age of children, led to significantly increased level of anti-inflammatory monocytes while the phagocytic activity of cells changed less. An increase in the phagocytic number for classical monocytes after incubation with GM-CSF *in vitro* was noted in children with IM at the age of 3–6 years while the phagocytic index of this fraction of monocytes remained unchanged. The level of the phagocytic index increased only in classical monocytes of children with IM aged 7–11 years. The presented results determine the scientific and clinical value of studying the mechanisms of the effect of GM-CSF on cells of the immune system and prove that this cytokine can be used in a new immunotherapeutic strategy for the treatment of IM.

Key words: *infectious mononucleosis, age of children, monocytes, subpopulations, phagocytic activity.*

Введение

Исследования, связанные с механизмами регуляции иммунных процессов при вирусных инфекциях, постоянно привлекают пристальное внимание [1, 22]. Это связано с необходимостью понимания фундаментальных процессов иммунных реакций, определяющих быструю и полную элиминацию вируса, что позволит разрабатывать новые методы лечения вирусных инфекций. Одним из таких заболеваний является инфекционный мононуклеоз (ИМ). На современном этапе, ИМ остается одной из актуальных проблем педиатрии и детской инфектологии. В последнее десятилетие отмечается тенденция к росту заболеваемости, и ИМ входит в рейтинг инфекционных болезней, представляющих наибольшую экономическую значимость (в 2020 г. экономический ущерб составил 2 299 817,4 тыс. рублей), причем в возрастной структуре ИМ преобладают дети до 14 лет, составляя 72,8–76,9% [3, 6, 7].

В настоящее время отсутствует единая концепция патогенеза ИМ. В основе патогенетических изменений при данном заболевании лежит лимфопролиферативный процесс, следствием которого является увеличение размеров периферических органов иммунной

системы и количества различных субпопуляций лимфоцитов в крови [32, 40]. Так, особенностью Эпштейна–Барр вируса (ВЭБ) является его свойство стимулировать инфицированные В-лимфоциты к неопределенно долгой пролиферации, отмечена активация регуляторных Т-клеток, что тормозит пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов [3, 10, 43].

Моноциты являются клетками врожденного иммунитета, которые осуществляют важные функции в иммунопатогенезе вирусных инфекций. Доказано участие моноцитов в механизмах системного воспалительного ответа, развивающегося на фоне инфекционного процесса [17, 27, 39]. Моноциты также принимают участие в механизмах регуляции иммунных процессов при вирусных инфекциях [1, 15, 23]. Иммунорегуляторными факторами моноцитов являются цитокины, а также активные формы азота и кислорода, которые интенсивно продуцируются клетками при их активации. [19, 20, 38]. Важным фактором иммунопатогенеза вирусных инфекций является то, что активированные моноциты мигрируют в ткань и дифференцируются в макрофаги и дендритные клетки, которые помимо эффекторных функций являются регуляторными и антигенпрезентирующими клетками и способны индуцировать развитие адаптивного иммунного ответа [14, 21, 25].

Исходя из уровней экспрессии молекул CD14 и CD16, моноциты делятся на три субпопуляции. Клетки, экспрессирующие только высокоаффинный рецептор к бактериальному липополисахариду и липополисахарид-связывающим белкам (корецептор к TLR4, CD14) и не экспрессирующие низкоаффинный рецептор для IgG (FcγRIII — CD16), определяются как классические моноциты ($CD14^{++}CD16^{-}$, classical monocytes). Данная субпопуляция моноцитов принимает активное участие в процессах фагоцитоза, синтезирует провоспалительные цитокины [12, 37, 42]. Клетки, слабее экспрессирующие молекулу CD14, но также экспрессирующие CD16-антиген, классифицируются как неклассические моноциты ($CD14^{+}CD16^{+}$, non-classical monocytes). Данная фракция моноцитов является противовоспалительной, обладает высокой тропностью к эндотелию и миграционной активностью [11, 28, 30, 35]. Моноциты с фенотипом $CD14^{++}CD16^{+}$ характеризуются как промежуточные (intermediate monocytes), обладают фагоцитарной активностью, способны процессировать и презентировать антигены, реализуют провоспалительную функцию [33].

Разработка новых подходов к терапии ИМ является одним из важнейших направлений современной медицины. Наиболее интересными в этой связи являются биологически активные регуляторные молекулы — цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками человека, обладающие выраженными плейотропными свойствами и участвующие в регуляции различных систем организма [1, 34]. К ним, в частности, относится гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF), уже нашедший применение в клинической практике, в том числе при лечении лейкозов и лейкопений [9, 24]. Считается, что основные иммунологические эффекты GM-CSF связаны с его влиянием на клетки моноцит/макрофагального ряда. В литературе доминирует мнение, что GM-CSF является провоспалительным цитокином, который способствует миграции макрофагальных клеток на периферию и поддерживает активацию M1-макрофагов [24, 26].

Целью исследования явилось изучение особенностей изменения субпопуляционного состава моноцитов и их фагоцитарной активности у детей с ИМ при воздействии GM-CSF *in vitro*.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находилось 84 ребенка в возрасте от 3 до 11 лет с ВЭБ-инфекцией, госпитализированных в инфекционное отделение КГБУЗ «Красноярская межрайонная детская клиническая больница № 1» г. Красноярска за период с 01.11.2019 г. по 09.06.2020 г. Критериями включения в исследование являлись: возраст пациентов мужского и женского пола от 3 до 6 лет и от 7 до 11 лет, диагноз ИМ средней и тяжелой степени. Критериями исключения из группы исследования явились больные с негладким течением ИМ (тяжелая нейтропения, тромбоцитопения и повышение аминотрансфераз более 5 норм), пациенты в возрасте до 3 лет и старше 11 лет, использование противовирусных и антибактериальных лекарственных средств, или препаратов, обладающих иммуномодулирующим действием в течение последних 14 дней, предшествующих поступлению в стационар, наличие другого инфекционного заболевания, перенесенного в течение последнего месяца перед включением пациента в исследование, а также его отказ от участия (отказ от подписания информированного согласия на участие в клиническом исследовании). Все наблюдаемые нами пациенты имели положительный тест на ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови и серологические маркеры острой ВЭБ-инфекции (ВЭБ-VCAIgM (+), ВЭБ-EA-DIgG (+)). Контрольную группу составили 40 практически здоровых детей аналогичного возрастного диапазона.

Взятие крови для проведения исследований проводили утром натощак с 8 до 9 часов.

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) (ρ = 1,077). Моноциты выделяли путем адгезии к пластику (чашки Петри, ЗАО «Олданс», Россия) в средеRPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной сыворотки. Выделенные моноциты разделяли на две пробы: контрольная (без GM-CSF) и опытная (50 нг GM-CSF на 1 мл клеточной суспензии). Определение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов в обеих пробах осуществляли после инкубации в течение 1 ч при температуре 37°C в CO_2-инкубаторе (Sanyo, Япония).

Субпопуляционный состав моноцитов и их фагоцитарную активность в обеих пробах исследовали методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами (Beckman Coulter, США), меченных PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD14-PE/CD45-ECD/CD16-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствие с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [18]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН [41]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов.

Для оценки фагоцитарной активности моноцитов использовали FITC-меченный (fluorescein isothiocyanate) стафилококковый белок А [4]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к стафилококковому белку А (разведен в бикарбонатном буфере, pH = 9,0) добавляли FITC (предварительно растворяли в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 ч, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию белка до 1 млн/мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченного белка А и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Для гашения адгезированного на поверхности моноцитов FITC-меченного белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов. Подсчитывали процент флуоресцирующих моноцитов (определяли как фагоцитарный индекс — ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число — ФЧ).

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартального размаха в виде 25 и 75 процентилей (Q_1 и Q_3). Достоверность различий между показателями независимых выборок (при сравнении показателей больных ИМ с контрольными значениями) оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий контрольных проб (без GM-CSF) с опытными пробами (с GM-CSF) определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

У больных ИМ детей в возрасте 3–6 лет на фоне снижения абсолютного количества моноцитов в крови выявляются атипичные моноциты (табл. 1). При этом обнаружены изменения субпопуляционного состава моноцитов, которые выражаются в увеличении процентного содержания $CD14^{++}CD16^{+}$ клеток, но при снижении количества $CD14^{+}CD16^{+}$-моноцитов по сравнению с контрольными значениями. После воздействия GM-CSF и в группе здоровых детей и у больных ИМ наблюдается понижение процентного уровня $CD14^{++}CD16^{+}$ клеток. Причем у больных детей содержание моноцитов с данным фенотипом остается значительно выше по сравнению с уровнем, выявленным у детей контрольной группы. Кроме того, у детей с ИМ в возрасте 3–6 лет под влиянием GM-CSF отмечается повышение процентного количества $CD14^{+}CD16^{+}$-моноцитов относительно исходного уровня, что приводит к увеличению содержания этих клеток и относительно контрольных значений.

Абсолютное количество моноцитов в крови у детей с ИМ в возрасте 7–11 лет также понижено по сравнению с контрольными показателями (табл. 2). При этом в крови у больных данной возрастной группы обнаружены атипичные моноциты. Особенностью субпопуляционного состава моноцитов у детей с ИМ является увеличение процентного содержания $CD14^{++}CD16^{+}$-клеток на фоне повышения уровня $CD14^{+}CD16^{+}$-моноцитов по сравнению с контрольными значениями. После инкубации моноцитов с GM-CSF у больных ИМ в возрасте 7–11 лет выявляется пониженный уровень $CD14^{++}CD16^{-}$-клеток и более высокое содержание $CD14^{++}CD16^{+}$- и $CD14^{+}CD16^{+}$-моноцитов по сравнению с контрольными значениями. Причем количество $CD14^{+}CD16^{+}$-клеток у де-

Таблица 1. Субпопуляционный состав моноцитов крови у детей с инфекционным мононуклеозом в возрасте 3–6 лет [Me (Q_1–Q_3)]

Table 1. blood monocytes subset composition in 3–6 year-old children with infectious mononucleosis [Me (Q_1–Q_3)]

Показатели Parameters	**Контрольная группа** Control group	**Больные ИМ** Patients of IM	**p**
Моноциты, 10^9/л Monocytes, 10^9/L	1,06 (0,77–1,59)	0,45 (0,21–1,04)	0,028
Моноциты, % Monocytes, %	8,0 (6,0–11,0)	6,5 (4,0–10,0)	
Атипичные моноциты, 10^9/л Atypical monocytes, 10^9/L	0,0	1,57 (1,00–2,99)	< 0,001
Атипичные моноциты, % Atypical monocytes, %	0,0	12,5 (7,0–20,0)	< 0,001
Контроль/Control			
$CD14^{++}CD16^-$, %	71,93 (41,90–89,15)	83,66 (78,33–84,50)	
$CD14^{++}CD16^+$, %	4,39 (2,99–8,11)	9,23 (5,97–12,66)	0,011
$CD14^+CD16^+$, %	23,72 (15,33–44,76)	9,31 (2,92–9,37)	< 0,001
GM-CSF			
$CD14^{++}CD16^-$, %	88,86 (74,41–90,00)	78,34 (74,66–92,57)	
$CD14^{++}CD16^+$, %	1,28 (0,56–2,87) p = 0,038	4,78 (3,29–6,11) p = 0,045	0,003
$CD14^+CD16^+$, %	9,57 (7,81–18,29)	17,88 (11,25–48,04) p = 0,004	0,022

тей с ИМ значительно повышается под влиянием GM-CSF и по сравнению с исходными значениями.

При сравнении величин показателей количества моноцитов и их субпопуляционного состава в двух возрастных группах обнаружено, что у детей контрольной группы в возрасте 7–11 лет снижено процентное содержание $CD14^{++}CD16^+$- и $CD14^+CD16^+$-моноцитов без GM-CSF (p = 0,018 и p = 0,034 соответственно) (см. табл. 1 и 2). Различий в величинах данных показателей у детей с ИМ в зависимости от возраста не обнаружено.

При исследовании фагоцитарной активности моноцитов у больных ИМ 3–6 лет при отсутствии регуляторного воздействия для клеток с фенотипами $CD14^{++}CD16^-$ и $CD14^{++}CD16^+$ характерно снижение ФИ и ФЧ по сравнению с контрольными значениями (табл. 3). Кроме того, для моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^+$

Таблица 2. Субпопуляционный состав моноцитов крови у детей с инфекционным мононуклеозом в возрасте 7–11 лет [Me (Q_1–Q_3)]

Table 2. blood monocyte subset composition in 7–11 year-old children with infectious mononucleosis [Me (Q_1–Q_3)]

Показатели Parameters	**Контрольная группа** Control group	**Больные ИМ** Patients with IM	**p**
Моноциты, 10^9/л Monocytes, 10^9/L	1,11 (0,49–1,71)	0,38 (0,16–0,74)	0,033
Моноциты, % Monocytes, %	8,0 (5,0–11,5)	6,0 (3,5–8,5)	
Атипичные моноциты, 10^9/л Atypical monocytes, 10^9/L	0,0	1,06 (0,11–2,79)	< 0,001
Атипичные моноциты, % Atypical monocytes, %	0,0	8,5 (1,0–19,5)	< 0,001
Контроль/Control			
$CD14^{++}CD16^-$, %	81,77 (78,87–88,84)	89,05 (78,06–90,90)	
$CD14^{++}CD16^+$, %	1,56 (0,81–3,76)	3,51 (2,25–15,16)	0,040
$CD14^+CD16^+$, %	15,82 (8,74–20,06)	6,68 (6,15–7,47)	0,009
GM-CSF			
$CD14^{++}CD16^-$, %	83,48 (78,39–92,80)	70,69 (51,55–79,11)	0,010
$CD14^{++}CD16^+$, %	1,50 (0,90–3,95)	5,46 (4,28–8,03)	0,004
$CD14^+CD16^+$, %	14,81 (5,82–20,69)	23,07 (19,64–40,06) p < 0,001	0,036

Таблица 3. Фагоцитарная активность моноцитов крови у детей с инфекционным мононуклеозом в возрасте 1–3 года [Me (Q_1–Q_3)]

Table 3. Blood monocyte phagocytic activity in 1–3 year-old children with infectious mononucleosis [Me (Q_1–Q_3)]

Показатели Parameters	Контрольная группа Control group		Больные ИМ Patients with IM		p
	ФИ, % PI, %	ФЧ PN	ФИ, % PI, %	ФЧ PN	
Контроль/Control					
$CD14^{++}CD16$	81,18 (76,96–93,28)	3,75 (3,20–4,58)	26,94 (22,02–27,11)	2,64 (2,59–2,68)	ФИ | PI = 0,002 ФЧ | PN = 0,042
$CD14^{++}CD16^{+}$	99,98 (99,56–99,99)	8,01 (6,12–10,19)	37,75 (37,30–47,41)	2,77 (2,42–4,44)	ФИ | PI < 0,001 ФЧ | PN < 0,001
$CD14^{+}CD16^{+}$	99,07 (97,79–99,46)	5,65 (4,98–6,49)	38,30 (23,07–42,62)	3,62 (2,66–9,86)	ФИ | PI < 0,001
GM-CSF					
$CD14^{++}CD16$	93,09 (80,81–93,24)	3,76 (3,63–4,70)	46,09 (34,23–64,07) p < 0,001	5,64 (4,89–8,03) p = 0,004	ФИ | PI = 0,003 ФЧ | PN = 0,009
$CD14^{++}CD16^{+}$	100,00 (100,00–100,00)	9,65 (8,27–11,40)	42,38 (34,22–50,60)	3,72 (2,84–6,06)	ФИ | PI < 0,001 ФЧ | PN < 0,001
$CD14^{+}CD16^{+}$	100,00 (99,17–100,00) p = 0,049	6,34 (5,52–11,10) p = 0,043	45,03 (33,12–52,52)	3,47 (2,41–6,78)	ФИ | PI < 0,001 ФЧ | PN = 0,029

Примечание. ФИ — фагоцитарный индекс (в %), ФЧ — фагоцитарное число (в о.е.).
Note. PI — phagocytic index (in %), PN — phagocytic number (in r.u.).

выявляется пониженный уровень ФИ относительно значений, выявленных у детей контрольной группы. После воздействия GM-CSF на моноциты обнаружено повышение значений ФИ и ФЧ для клеток с фенотипом $CD14^{+}CD16^{+}$ у детей контрольной группы и для $CD14^{++}CD16^{-}$ моноцитов у детей с ИМ. При этом, если после воздействия GM-CSF уровень ФИ для $CD14^{++}CD16^{-}$ клеток у больных детей 3–6 лет остается пониженным по сравнению с контрольными значениями, то величина ФЧ для моноцитов с данным фенотипом при ИМ повышается относительно контрольного диапазона. Уровни ФИ и ФЧ у больных детей после инкубации с GM-CSF для клеток с фенотипами $CD14^{++}CD16^{+}$ и $CD14^{+}CD16^{+}$ снижены относительно контрольных значений.

У больных ИМ в возрасте 7–11 лет в контрольных пробах наблюдается снижение величин ФИ для моноцитов с фенотипами $CD14^{++}CD16^{+}$ и $CD14^{+}CD16^{+}$ относительно контрольных значений (табл. 4). При инкубации с GM-CSF только у больных детей выявляется повышение уровней ФИ и ФЧ для $CD14^{++}CD16^{-}$ клеток. При этом, у детей с ИМ для клеток с фенотипом $CD14^{++}CD16^{-}$ наблюдается увеличение

Таблица 4. Фагоцитарная активность моноцитов крови у детей с инфекционным мононуклеозом в возрасте 7–11 лет [Me (Q_1–Q_3)]

Table 4. Blood monocyte phagocytic activity in 7–11 year-old children with infectious mononucleosis [Me (Q_1–Q_3)]

Показатели Parameters	Контрольная группа Control group		Больные ИМ Patients with IM		p
	ФИ, % PI, %	ФЧ PN	ФИ, % PI, %	ФЧ PN	
Контроль/Control					
$CD14^{++}CD16^{-}$	24,34 (20,68–87,46)	3,74 (3,15–4,01)	22,37 (15,00–28,79)	2,77 (2,54–4,99)	
$CD14^{++}CD16^{+}$	99,58 (66,66–100,00)	5,44 (2,64–7,89)	42,43 (26,42–47,12)	3,69 (1,95–5,87)	ФИ | PI = 0,004
$CD14^{+}CD16^{+}$	77,77 (66,11–98,12)	5,49 (5,12–6,36)	42,09 (23,34–52,68)	4,93 (2,92–7,28)	ФИ | PI = 0,006
GM-CSF					
$CD14^{++}CD16^{-}$	25,97 (21,78–85,68)	3,55 (3,02–5,32)	48,34 (39,42–62,08) p = 0,006	6,36 (5,78–8,40) p = 0,003	ФЧ | PN = 0,007
$CD14^{++}CD16^{+}$	97,71 (61,90–100,00)	6,93 (3,73–9,19)	47,06 (37,68–62,20)	3,80 (3,11–5,86)	ФИ | PI = 0,008 ФЧ | PN = 0,047
$CD14^{+}CD16^{+}$	77,87 (62,35–98,62)	5,13 (4,05–6,33)	44,49 (28,67–60,03)	3,85 (2,86–6,44)	ФИ | PI = 0,009 ФЧ | PN = 0,002

Примечание. ФИ — фагоцитарный индекс (в %), ФЧ — фагоцитарное число (в о.е.).
Note. PI — phagocytic index (in %), PN — phagocytic number (in r.u.).

ФЧ относительно контрольных значений, тогда как для моноцитарных фракций с фенотипами $CD14^{++}CD16^{+}$ и $CD14^{+}CD16^{+}$ установлено понижение величин ФИ и ФЧ.

При сравнении показателей фагоцитарной активности у детей в зависимости от возраста обнаружено, что у детей контрольной группы в возрасте 7–11 лет понижена величина ФИ в контрольных пробах для моноцитов с фенотипами $CD14^{++}CD16^{-}$ ($p = 0,007$) и $CD14^{+}CD16^{+}$ ($p = 0,045$) (см. табл. 3 и 4). Кроме того, у детей контрольной группы в возрасте 7–11 лет после инкубации с GM-CSF по сравнению с показателями детей 3–6 лет снижены величины ФИ для всех трех фракций моноцитов: для $CD14^{++}CD16^{-}$- ($p = 0,006$), $CD14^{++}CD16^{+}$- ($p = 0,048$) и $CD14^{+}CD16^{+}$-клеток ($p = 0,001$). У детей с ИМ различий в показателях фагоцитарной активности моноцитов в зависимости от возрастной группы не обнаружено.

Обсуждение

Моноциты являются клетками врожденного иммунитета, которые при вирусных инфекциях реализуют иммуновоспалительные процессы, а их потомки (макрофаги и дендритные клетки) индуцируют реакции адаптивного иммунитета [1, 30]. При этом различные субпопуляции моноцитов, мигрируя в ткань, могут дифференцироваться в макрофаги и дендритные клетки с различной функциональной активностью [5, 13]. В то же время на фоне вирусных инфекций может меняться количество моноцитов, их субпопуляционный состав и функциональная активность [16, 33]. Действительно, нами установлено, что абсолютное количество моноцитов в крови у детей с ИМ снижено в возрастных группах 3–6 и 7–11 лет. Изменения субпопуляционного состава моноцитов при ИМ также не зависят от возрастной группы больных детей и определяются повышением процентного содержания промежуточных моноцитов ($CD14^{++}CD16^{+}$) и снижением относительного количества неклассических ($CD14^{+}CD16^{+}$). Именно промежуточные моноциты активно экспрессируют антигены MHC II класса, при инфекции синтезируют и секретируют IL-1β и TNFα, а также интенсивно экспрессируют хемокиновые рецепторы CCR2 и CXCR4, что обеспечивает им миграцию в ткань, где они дифференцируются в макрофаги и дендритные клетки с высоким уровнем функциональной активности [13, 31]. Неклассические моноциты определяются как противовоспалительные клетки, усиливают мобилизацию и активность регуляторных Т-лимфоцитов, но слабее дифференцируются в макрофаги [30, 36]. Выявленная особенность перераспределения субпопуляционного состава моноцитов в направлении фракции промежуточных в острый период ИМ у детей характеризует повышение роли провоспалительных процессов, стимулируемых промежуточными моноцитами, и снижение активности противовоспалительных реакций, опосредованных функцией неклассических моноцитов. Также необходимо отметить, что если у здоровых детей в процессе онтогенеза выявляются особенности в субпопуляционном составе моноцитов (снижение процентного количества промежуточных и неклассических моноцитов), то на фоне острого ИМ подобные различия отсутствуют.

На фоне изменения субпопуляционного состава моноцитов выявляется и нарушение их фагоцитарной активности. Однако функциональная активность моноцитов при ИМ зависит от возрастной группы больных детей. Так, у детей 3–6 лет с ИМ снижены уровни ФИ и ФЧ для классических и промежуточных моноцитов, тогда как для фракции неклассических моноцитов определяется понижение величины ФЧ. Следовательно, у больных данной возрастной группы снижено количество провоспалительных клеток, вступающих в процесс фагоцитоза и снижена реактивность самих моноцитов. В то же время, как уже было отмечено выше, для неклассических моноцитов более характерна регуляторная функция, соответственно, у больных 3–6 лет в процесс фагоцитоза вступает меньшее количество клеток данной фракции, но их фагоцитарная активность остается на уровне нормы. У детей с ИМ 7–11 лет фагоцитарная активность классических моноцитов находится на уровне возрастной нормы, тогда как для субпопуляций промежуточных и неклассических моноцитов выявляется снижение количества клеток, вступающих в процесс фагоцитоза. Подобные различия в функциональной реакции моноцитов у детей с ИМ двух возрастных групп, по-видимому, связаны с онтогенетическими процессами в иммунной системе. В частности, в обзоре Moraes-Pinto M.I. и соавт. (2021) отмечено, что фагоцитирующие клетки у детей раннего возраста слабее экспрессируют адгезионные молекулы и обладают пониженной фагоцитарной активностью [29].

После инкубации с GM-CSF *in vitro* выявляется изменение субпопуляционного состава моноцитов как у здоровых детей, так и больных ИМ. Так, у детей в возрасте 3–6 лет независимо от наличия/отсутствия ИМ в результате воздействия GM-CSF снижается количество промежуточных моноцитов относительно исходных значений, относительное содержание которых, тем не менее, остается повышенным у больных детей. Кроме того, в обеих возрастных группах у детей с ИМ после инкубации с GM-CSF повышалось процентное количество неклас-

сических моноцитов, что привело к превышению их содержания у больных относительно контрольных значений. Также у больных детей 7–11 лет после инкубации с GM-CSF обнаружено снижение количества классических и сохранение повышенного уровня промежуточных моноцитов относительно контрольных значений. Необходимо отметить, что в настоящее время основной концепцией формирования субпопуляций моноцитов является линейная дифференцировка: классические моноциты → промежуточные → неклассические [14, 31, 42]. Следовательно, механизм воздействия GM-CSF на моноциты реализуется в перераспределении субпопуляционного состава при стимуляции их дифференцировки.

Часовая инкубация моноцитов с GM-CSF также повлияла и на их фагоцитарную активность. Так, у здоровых детей 3–6 лет под после инкубации моноцитов с GM-CSF повысилась фагоцитарная активность неклассических моноцитов (по показателям ФИ и ФЧ). В то же время у детей с ИМ обеих возрастных групп инкубация с GM-CSF привела к увеличению функциональной активности классических моноцитов (также по показателям ФИ и ФЧ). Причем, если у больных 3–6 лет ФИ классических моноцитов после воздействия GM-CSF также остается пониженным относительно контрольных значений (как и в контрольных пробах), то ФЧ данной фракции клеток у больных 3–6 и 7–11 лет значительно превышает контрольные уровни. Фагоцитарная активность промежуточных и неклассических моноцитов у детей обеих возрастных групп после инкубации с GM-CSF остается пониженной.

Можно заключить, что GM-CSF влияет и на фагоцитарную активность моноцитов у детей. Известно, что среди клеток крови именно неклассические моноциты являются основными продуцентами GM-CSF [21]. Однако реакция на фактически аутокринную стимуляцию функциональной активности выявлена только у здоровых детей 3–6 лет, что, по-видимому, связано с онтогенетическими особенностями иммунной системы. В то же время у детей с ИМ, независимо от возрастной группы, реакция на GM-CSF выявляется только для классических моноцитов, то есть наименее зрелой фракции моноцитов крови, но реализующих провоспалительные функции и фагоцитарную активность.

Кроме того, выявляются онтогенетические особенности изменения фагоцитарной активности моноцитов. У детей контрольной группы в возрасте 7–11 лет в контрольных пробах снижено количество $CD14^{++}CD16^{-}$- и $CD14^{+}CD16^{+}$-моноцитов, вступающих в фагоцитоз. В то же время после инкубации с GM-CSF у здоровых детей старшей возрастной группы, по сравнению с показателями здоровых детей младшей возрастной группы, снижено количество всех трех субпопуляций моноцитов, вступающих в процесс фагоцитоза. При этом каких-либо онтогенетических изменений у больных ИМ не обнаружено. Известно, что в большинстве случаев в раннем детстве первичное инфицирование ВЭБ протекает бессимптомно или со скудной симптоматикой, тогда как у детей раннего школьного возрастов в 45% случаев возникает типичная клиническая форма ИМ [8]. Исходя из онтогенетических и иммунопатофизиологических особенностей субпопуляционного состава моноцитов и их фагоцитарной активности у детей в возрасте 3–6 и 7–11 лет, можно предположить, что симптоматика ИМ (прежде всего, связанная с иммуновоспалительными процессами), в большей степени, определяется исходным состоянием в иммунной системе, тогда как при инфекционном заболевании онтогенетические особенности нивелируются за счет реакции иммунной системы на возбудитель.

Заключение

Таким образом, у детей на фоне развития ИМ меняется субпопуляционный состав моноцитов в крови и нарушается их фагоцитарная активность. Изменения субпопуляционного состава моноцитов на фоне острого ИМ не зависят от возраста (3–6 и 7–11 лет) и характеризуются повышением количества провоспалительных (промежуточных) моноцитов и снижением содержания противовоспалительных (неклассических) моноцитов. Особенности нарушения фагоцитарной активности моноцитов у детей с ИМ зависят от возраста. У больных 3–6 лет снижена фагоцитарная активность всех субпопуляций моноцитов, тогда как у детей с ИМ 7–11 лет понижена фагоцитарная активность промежуточных и неклассических моноцитов. При воздействии GM-CSF *in vitro* на моноциты у больных ИМ независимо от возраста значительно повышается уровень противовоспалительных моноцитов, в то время как фагоцитарная активность клеток меняется слабее. У детей 3–6 лет после инкубации с GM-CSF повышается ФЧ для классических моноцитов, тогда как ФИ данной фракции моноцитов остается без изменений. У больных ИМ 7–11 лет также только у классических моноцитов повышается уровень ФИ. Приведенные результаты определяют научную и клиническую ценность изучения механизмов влияния GM-CSF на клетки иммунной системы и доказывают, что данный цитокин может быть использован в новой иммунотерапевтической стратегии лечения ИМ.

Список литературы/References

1. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андронова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.А., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. Красноярск: Поликор, 2021. 563 с. [Kozlov V.A., Tikhonova E.P., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Andronova N.V., Anisimova E.N., Golovkin A.S., Demina D.V., Zdzitovetsky D.E., Kalinina Y.S., Kasparov E.V., Kozlov I.G., Korsunsky I.A., Kudlay D.A., Kuzmina T.Yu., Minoranskaya N.S., Prodeus A.P., Starikova E.A., Cherdantsev D.V., Chesnokov A.B., Gear P.A., Borisov A.G. Clinical immunology. A practical guide for infectious diseases. *Krasnoyarsk: Polikor, 2021, 563 p. (In Russ.)*]
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуоримерического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26*
3. Куликова М.М., Соломай Т.В., Семененко Т.А. Клинико-лабораторные особенности первичной острой и реактивации хронической Эпштейна–Барр вирусной инфекции у детей (систематический обзор и метаанализ) // Детские инфекции. 2022. Т. 21, № 1. С. 49–55. [Kulikova M.M., Solomay T.V., Semenenko T.A. Clinical and laboratory differences between primary acute and reactivation of chronic Epstein–Barr viral infection in children (systematic review and meta-analysis). *Detskie infektsii = Children Infections, 2022, vol. 21, no. 1, pp. 49–55. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2022-21-1-49-55*
4. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 51–60. [Savchenko A.A., Gvozdev I.I., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavcev I.V., Moshev A.V. Phagocytic activity and blood neutrophils respiratory burst state features amongst widespread purulent peritonitis patients in the postoperative period dynamics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 51–60. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-51-60*
5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Зависимость фенотипа дендритных клеток от содержания провоспалительных моноцитов крови у больных раком почки // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 4. С. 689–702. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V. Dependence of the phenotype of dendritic cells on the content of proinflammatory blood monocytes in patients with kidney cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2019, vol. 21, no. 4, pp. 689–702. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702*
6. Соломай Т.В., Симонова Е.Г., Семененко Т.А. Научное обоснование создания и перспективы развития системы эпидемиологического надзора за инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна–Барр // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2022. Т. 21, № 1. С. 21–31. [Solomay T.V., Simonova E.G., Semenenko T.A. Scientific Substantiation of the Creation and Prospects for the Development of an Epidemiological Surveillance System for Infection Caused by the Epstein–Barr Virus. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2022, vol. 21, no. 1, pp. 21–31. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2022-21-1-21-31*
7. Черенова Л.П., Мирекина Е.В., Лисина О.А., Иргазиева Г.К. Дифференциальная диагностика кори и инфекционного мононуклеоза // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2022. Т. 11, № 1. С. 64–68. [Cherenova L.P., Merekina E.V., Lisina O.A., Irgazieva G.K. Differential diagnosis of measles and infectious mononucleosis. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2022, vol. 11, no. 1, pp. 64–68. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/2305-3496-2022-11-1-64-68*
8. Шульженко А.Е., Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н. Герпесвирусные инфекции: современный взгляд на проблему. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. 344 с. [Shulzhenko A.E., Shchubelko R.V., Zuikova I.N. Herpesvirus infections: a modern view of the problem. *Moscow: GEOTAR-Media, 2022. 344 p. (In Russ.)*]
9. Achuthan A.A., Lee K.M.C., Hamilton J.A. Targeting GM-CSF in inflammatory and autoimmune disorders. *Semin. Immunol., 2021, vol. 54: 101523. doi: 10.1016/j.smim. 2021.101523*
10. Albanese M., Tagawa T., Hammerschmidt W. Strategies of Epstein-Barr virus to evade innate antiviral immunity of its human host. *Front. Microbiol. 2022, vol. 13: 955603. doi: 10.3389/fmicb.2022. 955603*
11. Alkhani A., Levy C.S., Tsui M., Rosenberg K.A., Polovina K., Mattis A.N., Mack M., Van Dyken S., Wang B.M., Maher J.J., Nijagal A. Ly6cLo non-classical monocytes promote resolution of rhesus rotavirus-mediated perinatal hepatic inflammation. *Sci. Rep., 2020, vol. 10, no. 1: 7165. doi: 10.1038/s41598-020-64158-2*
12. Barman P.K., Shin J.E., Lewis S.A., Kang S., Wu D., Wang Y., Yang X., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M., Messaoudi I., Benayoun B.A., Goodridge H.S. Production of MHCII-expressing classical monocytes increases during aging in mice and humans. *Aging Cell, 2022, vol. 21, no. 10, pp. 13701. doi: 10.1111/acel.13701*
13. Chilunda V., Martinez-Aguado P., Xia L.C., Cheney L., Murphy A., Veksler V., Ruiz V., Calderon T.M., Berman J.W. Transcriptional changes in CD16$^+$ monocytes may contribute to the pathogenesis of COVID-19. *Front. Immunol., 2021, vol. 24, no. 12, pp. 665773. doi: 10.3389/fimmu. 2021.665773*
14. Coillard A., Segura E. In vivo differentiation of human monocytes. *Front. Immunol., 2019, vol. 13, no. 10, pp. 1907. doi: 10.3389/fimmu. 2019.01907*
15. Congy-Jolivet N., Cenac C., Dellacasagrande J., Puissant-Lubrano B., Apoil P.A., Guedj K., Abbas F., Laffont S., Sourdet S., Guyonnet S., Nourhashemi F., Guéry J.C., Blancher A. Monocytes are the main source of STING-mediated IFN-α production. *EBioMedicine, 2022, vol. 80: 104047. doi: 10.1016/j.ebiom. 2022.104047*
16. Falck-Jones S., Österberg B., Smed-Sörensen A. Respiratory and systemic monocytes, dendritic cells, and myeloid-derived suppressor cells in COVID-19: Implications for disease severity. *J. Intern. Med., 2022, vol. 23, no. 10, pp. 1111. doi: 10.1186/s13075-017-1237-9*

17. Farina A., Rosato E., York M., Gewurz B.E., Trojanowska M., Farina G.A. Innate immune modulation induced by EBV lytic infection promotes endothelial cell inflammation and vascular injury in scleroderma. *Front. Immunol., 2021, no. 12: 651013. doi: 10.3389/fimmu. 2021.651013*
18. Finak G., Langweiler M., Jaimes M., Malek M., Taghiyar J., Korin Y., Raddassi K., Devine L., Obermoser G., Pekalski M.L., Pontikos N., Diaz A., Heck S., Villanova F., Terrazzini N., Kern F., Qian Y., Stanton R., Wang K., Brandes A., Ramey J., Aghaeepour N., Mosmann T., Scheuermann R.H., Reed E., Palucka K., Pascual V., Blomberg B.B., Nestle F., Nussenblatt R.B., Brinkman R.R., Gottardo R., Maecker H., McCoy J.P. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human Immuno Phenotyping Consortium. *Sci. Rep., 2016, vol. 6: 20686. doi: 10.1038/srep20686*
19. Jahan H., Siddiqui N.N., Iqbal S., Basha F.Z., Shaikh S., Pizzi M., Choudhary M.I. Suppression of COX-2/PGE2 levels by carbazole-linked triazoles via modulating methylglyoxal-AGEs and glucose-AGEs — induced ROS/NF-κB signaling in monocytes. *Cell. Signal, 2022, vol. 97: 110372. doi: 10.1016/j.cellsig. 2022.110372*
20. Kabanov D.S., Grachev S.V., Prokhorenko I.R. Monoclonal antibody to CD14, TLR4, or CD11b: impact of epitope and isotype specificity on ROS generation by human granulocytes and monocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev., 2020, vol. 2020: 5708692. doi: 10.1155/2020/5708692*
21. Kaur K., Bachus H., Lewis C., Papillion A.M., Rosenberg A.F., Ballesteros-Tato A., León B. GM-CSF production by nonclassical monocytes controls antagonistic LPS-driven functions in allergic inflammation. *Cell. Rep., 2021, vol. 37, no. 13: 110178. doi: 10.1016/j.celrep. 2021.110178*
22. Khan S., Siddique R., Hao X., Lin Y., Liu Y., Wang X., Hua L., Nabi G. The COVID-19 infection in children and its association with the immune system, prenatal stress, and neurological complications. *Int. J. Biol. Sci, 2022, vol. 18, no. 2, pp. 707 716. doi: 10.7150/ijbs.66906*
23. Kwissa M., Nakaya H.I., Onlamoon N., Wrammert J., Villinger F., Perng G.C., Yoksan S., Pattanapanyasat K., Chokephaibulkit K., Ahmed R., Pulendran B. Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell. Host. Microbe., 2014, vol. 16, no. 1, pp. 115–270. doi: 10.1016/j.chom. 2014.06.001*
24. Lazarus H.M., Pitts K., Wang T., Lee E., Buchbinder E., Dougan M., Armstrong D.G., Paine R. 3rd, Ragsdale C.E., Boyd T., Rock E.P., Gale R.P. Recombinant GM-CSF for diseases of GM-CSF insufficiency: correcting dysfunctional mononuclear phagocyte disorders. *Front. Immunol., 2023, vol. 13, 1069444. doi: 10.3389/fimmu. 2022.1069444*
25. Li F., Piattini F., Pohlmeier L., Feng Q., Rehrauer H., Kopf M. Monocyte-derived alveolar macrophages autonomously determine severe outcome of respiratory viral infection. *Sci. Immunol., 2022, vol. 7, no. 73: 5761. doi: 10.1126/sciimmunol.abj5761*
26. Lotfi N., Zhang G.X., Esmaeil N., Rostami A. Evaluation of the effect of GM-CSF blocking on the phenotype and function of human monocytes. *Sci. Rep., 2020, vol. 10, no. 1: 1567. doi: 10.1038/s41598-020-58131-2*
27. Michel M., Malergue F., Ait Belkacem I., Bourgoin P., Morange P.E., Arnoux I., Miloud T., Million M., Tissot-Dupont H., Mege J.L., Vitte J., Busnel J.M. A rapid, easy, and scalable whole blood monocyte CD169 assay for outpatient screening during SARS-CoV-2 outbreak, and potentially other emerging disease outbreaks. *SAGE Open Med., 2022, vol. 10, 20503121221115483. doi: 10.1177/20503121221115483*
28. Mohamedaly S., Levy C.S., Korsholm C., Alkhani A., Rosenberg K., Ashouri J.F., Nijagal A. hepatic Ly6CLo non-classical monocytes have increased Nr4a1 (Nur77) in murine biliary atresia. *J. Clin. Med., 2022, vol. 11, no. 18, pp. 5290. doi: 10.3390/jcm11185290*
29. Moraes-Pinto M.I., Suano-Souza F., Aranda C.S. Immune system: development and acquisition of immunological competence. *J. Pediatr. (Rio J.), 2021, vol. 97, suppl. 1, pp. S59–S66. doi: 10.1016/j.jped. 2020.10.006*
30. Narasimhan P.B., Marcovecchio P., Hamers A.AJ., Hedrick C.C. Nonclassical monocytes in health and disease. *Annu. Rev. Immunol., 2019, vol. 37, pp. 439–456. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053119*
31. Ożańska A., Szymczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol., 2020, vol. 92, no. 1: e12883. doi: 10.1111/sji.12883*
32. Páez-Guillán E.M., Campos-Franco J., Alende R., Garitaonaindia Y., González-Quintela A. Transient hypertriglyceridemia: a common finding during Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Lipids Health Dis., 2021, vol. 20, no. 1: 177. doi: 10.1186/s12944-021-01603-9*
33. Rutkowska E., Kwiecień I., Kłos K., Rzepecki P., Chciałowski A. Intermediate monocytes with PD-L1 and CD62L expression as a possible player in active SARS-CoV-2 infection. *Viruses, 2022, vol. 14, no 4: 819. doi: 10.3390/v14040819*
34. Saxton R.A., Glassman C.R., Garcia K.C. Emerging principles of cytokine pharmacology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov., 2023, vol. 22, no. 1, pp. 21–37. doi: 10.1038/s41573-022-00557-6*
35. Schünemann L.M., Schuberth H.J. Non-classical monocytes contribute to innate immune training in cattle. *Innate Immun., 2022, vol. 28, no. 6, pp. 199–210. doi: 10.1177/ 17534259221114219*
36. Sebastian A., Sanju S., Jain P., Priya V.V., Varma P.K., Mony U. Non-classical monocytes and its potential in diagnosing sepsis post cardiac surgery. *Int. Immunopharmacol., 2021, vol. 99: 108037. doi: 10.1016/j.intimp. 2021.108037*
37. Shahzad F., Bashir N., Ali A., Jabeen S., Kashif M., Javaid K., Tahir R., Abbas A., Jahan S., Afzal N. Decreased classical monocytes and CD163 expression in TB patients: an indicator of drug resistance. *Braz. J. Microbiol., 2021, vol. 52, no. 2, pp. 607–617. doi: 10.1007/s42770-021-00454-x*
38. Silva T., Gomes L., Jeewandara C., Ogg G.S., Malavige G.N. Dengue NS1 induces phospholipase A2 enzyme activity, prostaglandins, and inflammatory cytokines in monocytes. *Antiviral. Res., 2022, vol. 202: 105312. doi: 10.1016/j.antiviral. 2022.105312*
39. Spiteri A.G., Ni D., Ling Z.L., Macia L., Campbell I.L., Hofer M.J., King N.J.C. PLX5622 reduces disease severity in lethal CNS infection by off-target inhibition of peripheral inflammatory monocyte production. *Front. Immunol., 2022, vol. 13: 851556. doi: 10.3389/fimmu. 2022.851556*
40. Sullivan K., Isabel S., Khodai-Booran N., Paton T.A., Abdulnoor M., Dipchand A.I., Hébert D., Ng V.L., Allen U.D. Epstein–Barr virus latent gene EBNA-1 genetic diversity among transplant patients compared with patients with infectious mononucleosis. *Clin. Transplant. 2019, vol. 33, no. 4: e13504. doi: 10.1111/ctr.13504*

41. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin. Cytom., 2018, vol. 94, no. 1, pp. 1–15. doi: 10.1002/ cyto.b.21626*
42. Wirthgen E., Hornschuh M., Wrobel I.M., Manteuffel C., Däbritz J. Mimicking of blood flow results in a distinct functional phenotype in human non-adherent classical monocytes. *Biology (Basel), 2021, vol. 10, no. 8: 748. doi: 10.3390/ biology10080748*
43. Zhang L. A common mechanism links Epstein–Barr virus infections and autoimmune diseases. *J. Med. Virol. 2023, vol. 95, no. 1: e28363. doi: 10.1002/jmv.28363*

Авторы:
Савченко А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;
Мартынова Г.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней с курсом ПО ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;
Иккес Л.А., ассистент кафедры детских инфекционных болезней с курсом ПО ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;
Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;
Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;
Беленюк В.Д., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:
Savchenko A.A., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Martynova G.P., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Pediatric Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Ikkes L.A., Assistent Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Belenjuk V.D., Junior Researcher, Laboratory of Cellular-Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.02.2023
Принята к печати 12.02.2023

Received 08.02.2023
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 457–468

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 457–468

ОЦЕНКА УРОВНЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ, ИНДУЦИРОВАННЫХ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19: РАЗРАБОТКА АНАЛИЗА БЫСТРОЙ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИТЕЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ НА ОСНОВЕ ПСЕВДОВИРУСА

А.А. Фунтиков[1], Н.А. Литвинова[1], Е.В. Зуев[1], С.В. Кулемзин[2], Р.Р. Шукуров[1]

[1] АО «ГЕНЕРИУМ», пгт. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, Россия
[2] ООО «ИМГЕН+», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Постоянное появление новых вариантов SARS-CoV-2 со свойствами ускользания от иммунного ответа, таких как Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529), ставит под сомнение степень опосредованного антителами иммунного ответа на вирус. Наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) против SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших и иммунизированных добровольцев является наиболее точным показателем уровня протективной активности. Для доклинических и клинических исследований вакцин необходимы высокочувствительные методы надежного и быстрого обнаружения ВНА против SARS-CoV-2. Кроме того, количественная оценка ВНА у переболевших COVID-19 субъектов может быть полезна для выявления потенциальных доноров для пассивной иммунизации и терапевтического применения иммуноглобулинов класса G. Псевдовирусы активно применяются в качестве альтернативы инфекционным вирусным изолятам I–II групп патогенности в серологических исследованиях для определения титров нейтрализующих антител, образующихся у вакцинированных или инфицированных добровольцев. Используя несколько псевдотипов с различными репортерными генами, возможно одновременное выявление антител к различным типам вирусов в одном биологическом образце. В настоящее время широко применяется псевдолентивирусная система, в которой псевдовирусные частицы получаются методом трансфекции клеток-продуцентов векторами мультиплазмидной системы из 4–5 плазмид: одна для векторного генома, вторая — для Gag-Pol, третья — для Rev, еще одна или две — для белка(ов) оболочки или для коэкспрессии меченого вирусного белка, как GAG-GFP или VPR-GFP, основным преимуществом которой является безопасность, обусловленная минимальным риском образования репликационно-компетентного вируса. В статье рассматривается разработка методики, позволяющей определить наличие вирусспецифических вируснейтрализующих антител к антигену SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и/или иммунизированных препаратами специфической профилактики здоровых добровольцев в реакции нейтра-

Адрес для переписки:
Фунтиков Андрей Александрович
601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, ул. Владимирская, 14, АО «ГЕНЕРИУМ».
Тел.: 8 (902) 882-08-76.
E-mail: aafuntikov@generium.ru

Contacts:
Andrey A. Funtikov
601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Vladimirskaya str., 14, JSC "GENERIUM".
Phone: +7 (902) 882-08-76.
E-mail: aafuntikov@generium.ru

Для цитирования:
Фунтиков А.А., Литвинова Н.А., Зуев Е.В., Кулемзин С.В., Шукуров Р.Р. Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 457–468. doi: 10.15789/2220-7619-EOV-4336

Citation:
Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R. Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 457–468. doi: 10.15789/2220-7619-EOV-4336

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-EOV-4336

лизации на культуре клеток HEK 293-T-hAce2 с применением псевдотипированных вирусных конструкций на основе вируса иммунодефицита человека. Показаны результаты разработки и валидации метода, перспективы его дальнейшего использования.

Ключевые слова: *реакция нейтрализации, псевдовирусные частицы, вируснейтрализующие антитела, COVID-19, SARS-CoV-2, иммунитет.*

EVALUATION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODY LEVEL AFTER NOVEL CORONAVIRUS INFECTION COVID-19: DEVELOPMENT OF AN INSTANT ASSAY ASSESSING PROTECTIVE ANTIBODIES USING A PSEUDOVIRUS-BASED REACTION

Funtikov A.A.[a], Litvinova N.A.[a], Zuev E.V.[a], Kulemzin S.V.[b], Shukurov R.R.[a]

[a] *JSC "GENERIUM", Volginsky, Petushinsky District, Vladimir Region, Russian Federation*
[b] *LLC "IMGEN+", Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. The continued emergence of SARS-CoV-2 variants with immune evasion properties of concern, such as Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529), calls into question the extent of the antibody-mediated immune response from the virus. The presence of virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in the blood serum of recovered and immunized volunteers is the most accurate indicator of the level of protective activity. Methods for reliable, sensitive and rapid detection of anti-SARS-CoV-2 nAbs are needed for preclinical and clinical vaccine research. In addition, quantification of virus-neutralizing antibodies in recovered COVID-19 subjects may be useful in identifying potential donors for passive immunization and therapeutic use of class G immunoglobulins. Pseudoviruses are actively used as an alternative to infectious viral isolates of pathogenicity groups I–II in serological studies to determine the titers of neutralizing antibodies formed in vaccinated or infected volunteers. In addition, using several pseudotypes with different reporter genes, it is possible to simultaneously detect antibodies to different types of viruses in one biological sample. Currently, the pseudolentiviral system is widely used, in which pseudoviral particles are obtained by transfection of producer cells with vectors of a multiplasmid system of 4–5 plasmids: one for the vector genome, the second for Gag-Pol, the third for Rev, and one or two for protein(s) envelope, or for the co-expression of a labeled viral protein such as GAG-GFP or VPR-GFP, the main advantage of which is safety due to the minimal risk of generating a replication-competent virus. The article discusses the development of a technique that allows to determine the presence of virus-specific neutralizing antibodies to the SARS-CoV-2 antigen in the blood serum of volunteers who have had a new coronavirus infection COVID-19 and/or immunized with specific prophylaxis drugs, healthy volunteers in a neutralization reaction on a HEK 293-cell culture. T-hAce2 using pseudotyped viral constructs based on human immunodeficiency virus. The results of the development and validation of the method, as well as its subsequent prospects for use, are shown.

Key words: *virus neutralization reaction, pseudotyped viral constructs, neutralizing antibodies, COVID-19, SARS-CoV-2, immunity.*

Введение

Коронавирусная инфекция COVID-19 была вызвана ранее неизвестным бетакоронавирусом (SARS-CoV-2), обнаруженным в образцах смывов бронхиального лаважа, полученных из легких в группе пациентов с пневмонией в китайском городе Ухань в декабре 2019 г. SARS-CoV-2 относится к роду *Coronaviridae*, подроду *Sarbecovirus* и является седьмым по счету известным коронавирусом, способным заражать человека [1].

SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом с оболочкой. На основании исследований, проведенных Xiaolu Tang установлено, что вирус представляет собой результат рекомбинации коронавируса летучих мышей со штаммом SARS-CoV-2 другого носителя. Предполагается, что человеку вирус передался от панголина: функциональные сайты белка пепломера вируса SARS-CoV-2 практически идентичны таковому у вируса, обнаруженного у панголинов [11].

В процессе эволюции у вируса происходят генетические мутации и формируются генетические линии, вместе составляющие дерево генетических поколений. Некоторые мутации могут сказываться на скорости распространения вируса, на тяжести вызываемого им заболевания или на эффективности тех или иных методов лечения. По состоянию на сентябрь 2022 г. выделяют следующие штаммы SARS-CoV-2: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Gamma (B.1.1.248), Omicron (B.1.1.529) [6] и привлекающая особое внимание исследователей линия Lambda (C.37), известная под названиями VUI-202102/03 или UK1188, частично похожая на штамм 501.V2, но отличающаяся наличием как мутации E484K, так и новой мутации F888L (замещение фенилаланина (F) на лейцин (L) в домене S2 белка-шипа).

Достижение коллективного иммунитета против SARS-CoV-2 естественным путем или путем вакцинации является конечной долгосрочной целью, которая позволит отменить применяемые в настоящее время меры социального контроля [6].

Скрининг на наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) также необходим для оценки коллективного иммунитета против SARS-CoV-2 и эффективности программ вакцинации, развернутых во многих странах с конца 2020 г.

Вакцины значительно сокращают количество госпитализаций и смертей от COVID-19. Те препараты, которые были разработаны в начале пандемии, продолжают обеспечивать защиту от тяжелых форм заболевания, вызванного новыми вариантами SARS-CoV-2.

Пока неизвестно, можно ли считать уровни ВНА единственной мерой защитного иммунитета против COVID-19, но недавнее успешное лечение тяжелобольных пациентов плазмой от переболевших добровольцев и препаратами моноклональных антител, содержащими высокие уровни ВНА, предполагает важную роль ВНА [3, 6, 8, 9, 13].

Первым разработанным методом, позволяющим определить ВНА, являлась реакция нейтрализации уменьшения бляшек (plaque reduction neutralization test, PRNT) или реакция нейтрализации макрометодом, которая определяет уровень ВНА путем нейтрализации вируса *in vitro*. Постановка реакции осуществлялась непосредственно в 6-, 12- или 24-луночных культуральных планшетах. Некоторые модификации реакции нейтрализации макрометодом подразумевают постановку в медицинских флаконах по типу ФО-10-НС. PRNT считается золотым стандартом для оценки ВНА (иммуноглобулинов класса G) от многих вирусных заболеваний [2, 5, 7].

Однако метод PRNT имеет несколько ограничений, которые делают его непригодным для крупномасштабных исследований образцов сыворотки, например, таких, как II–III фазы клинических исследований вакцин с участием добровольцев. PRNT технически сложен, имеет очень низкую пропускную способность, его трудно автоматизировать и, в случае SARS-CoV-2, получение результата возможно только через 72–96 ч — примерно столько времени необходимо вирусу для образования видимых бляшек. Кроме того, анализ данных обычно выполняется с использованием расчетов в электронной таблице Excel для определения титров нейтрализации (визуальный учет, например, формула Спирмена–Кербера [4]) или с помощью бесплатных статистических пакетов, таких как «Statistica», для выполнения пробит-регрессии. Визуальный учет реакции является субъективным, поскольку зависит от оценки эффекта бляшкообразования конкретным оператором, что в значительной степени может повлиять на интерпретацию результатов исследования.

Чтобы нивелировать технические недостатки метода PRNT, был разработан альтернативный тест, известный как реакция нейтрализации микрометодом (microneutralization assay, MNA). Реакция нейтрализации микрометодом с использованием сывороток крови, содержащих специфические антитела, *in vitro* является более объективным тестом для их определения [4, 10].

Этот анализ проводится на 96-луночных планшетах и включает иммуноокрашивание для визуализации инфицированных клеток, которые могут быть подсчитаны с помощью компьютерных программ анализа изображений, что существенно увеличивает производительность анализа по сравнению с подсчетом, выполняемым в PRNT.

Дальнейшее развитие MNA заключается в замене вируса II группы патогенности по классификации патогенности, действующей на территории Российской Федерации (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»), на псевдовирусные частицы. В связи с тем, что псевдовирусные частицы потенциально не являются возбудителем заболеваний человека или животных, они не относятся к определенной группе патогенов. Можно считать, что использование псевдовирусов возможно и безопасно в лабораториях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III–IV групп патогенности, особенно при использовании псевдовирусов на основе лентивирусов, поскольку псевдолентивирусная система ограничивается лишь одним поколением псевдовирусов, так как в инфицированных ими клетках отсутствуют вирусные белки, необходимые для образования вирусного потомства. Но, несмотря на отсутствие риска для персонала, населения, домашнего скота или окружающей среды, использование псевдовирусных конструкций все же следует ограничить лабораториями III–IV групп патогенности.

Псевдотипированные вирусы состоят из нереплицирующихся генетически модифицированных вирионов, которые составляют структурное и ферментативное ядро одного вируса, например, вируса везикулярного стоматита (VSV) или лентивируса (HIV), но несут поверхностные белки другого вируса (S-белок SARS-CoV-2), и кодируют поддающийся количественной оценке репортерный ген — ген люциферазы светлячка (FLUC) или люциферазы креветки (NLUC).

Инфекционность таких частиц — псевдовирусов — определяется уже поверхностными белками гетерологичного вируса и ограничивается лишь одним циклом инфекции, что обеспечивает биологическую безопасность этой системы.

В дополнение к вышесказанному необходимо отметить, что именно реакция нейтрализации патогенного агента ВНА, содержащимися в образцах сыворотки крови, с применением чувствительных клеточных культур является «золотым» стандартом определения протективной

активности. Ввиду использования нативного или псевдотипированного возбудителя, метод MNA позволяет максимально корректно моделировать биологический процесс, протекающий непосредственно в организме субъектов, не подвергая их какой-либо опасности, что позволяет в полной мере оценивать их иммунный статус.

Материалы и методы

Получение псевдовирусных конструкций

Рекомбинантные псевдовирусы на основе вируса иммунодефицита человека получали котрансфекцией плазмид PLV, psPAX2 и Sd19 в клетки-продуценты линии HEK-293T. Котрансфекцию проводили кальций-фосфатным методом при конфлюэнтности монослоя 50–70%. Для трансфекции клеток на одной чашке использовали 70 мкг смеси плазмид в соотношении PLV460 : psPAX2 : Sd19 = 3 : 2 : 2.

Через 7–8 ч после трансфекции с культуральных чашек удаляли среду с ДНК-преципитатом с помощью аспирации, однократно промывали чашки 10 мл стерильного PBS. Через 68–72 ч после трансфекции культуральную среду, содержащую псевдовирусные частицы, собирали в 50-миллилитровые конические пробирки, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин для удаления клеток и крупного клеточного дебриса и фильтровали с помощью системы для вакуумной фильтрации с размером пор 0,45 μм. Затем полученную среду объемом около 900 мл концентрировали на модуле системы Vivaflow 50 (Sartorius, Германия) до объема 90 мл. Для осаждения вируса 90 мл сконцентрированной среды наслаивали на 20% раствор сахарозы и центрифугировали на ультрацентрифуге Avanti J-301 (Beckman Coulter, США) при 24 000g в течение 90 мин с использованием ротора JS-24. Осадок псевдовируса ресуспендировали в 8 мл среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 2,5% инактивированной нагреванием эмбриональной сыворотки телят, аликвотировали и замораживали в жидком азоте.

После получения вирусного препарата проводили его титрование на клетках HEK 293T-hAce2. Методом проточной цитометрии находили процент трансдуцированных клеток, затем строили график уровня трансдукции от объема внесенного вирусного препарата и по его линейному участку вычисляли титр вируса в трансдукционных единицах.

Подготовка испытуемых образцов сыворотки

Первая часть биообразцов была получена от добровольцев в 2020 г. во время распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19 в России, вторая — от добровольцев в рамках протокола клинического исследования VCI-COV-III (разрешение МЗ РФ РКИ № 869 от 20.12.2021).

Криопробирки с биоматериалом были помещены в боксы со штативами крышками вверх. Заморозка, хранение и транспортировка биообразцов осуществлялись при температуре –70°C или ниже.

Перед началом анализа образцы сывороток инактивировали на водяной бане при температуре 56±2°C в течение 30 мин с целью разрушения компонентов системы комплемента.

Для постановки реакции нейтрализации на панелях использовались сыворотки без признаков хилеза, гемолиза, контаминации патогенной флорой. В исследовании по определению ВНА использовались 403 образца сыворотки крови, полученные от 137 добровольцев.

Принцип постановки метода

В лунки белого 96-луночного планшета Corning-3916 либо ThermoFisher 136101 вносили по 100 мкл суспензии клеток HEK-293T-hAce2 из расчета 15 000 кл/лунку. Для заполнения одного планшета использовали около 10 мл суспензии клеток.

Далее, перед внесением в U-образный планшет сыворотки разводили 1:5 (200 мкл сыворотки + 800 мкл среды) средой Opti-MEM 2,5% FBS.

В качестве положительного контроля применялась сыворотка, содержащая антитела к SARS-CoV-2, либо коммерческий препарат нейтрализующих антител производства ФГБУН ИМКБ СО РАН. Образец использовался в фиксированной концентрации 1 мкг/мл, при которой достигалась полная нейтрализация вирусных частиц.

Во все лунки предварительно вносили 80 мкл среды разведения, после этого добавляли 80 мкл испытуемой сыворотки, и с помощью многоканальной пипетки, установленной на 80 мкл, выполняли двукратные разведения сыворотки (содержимое лунок перемешивалось минимум 6–8 раз в каждом ряду), следуя вниз по планшету и сбрасывая в контейнер для обеззараживания отходов 100 мкл после смешивания в последнем ряду.

Референтная сыворотка или коммерческий положительный контроль всегда титровались до последней лунки и использовались при любой схеме постановки. Далее во все лунки, кроме лунок первого ряда, вносили раствор вирусных частиц в среде Opti-MEM 2,5% FBS, из расчета 10 000 вирусных единиц (TU) на лунку в 80 мкл среды. После этого содержимое лунок перемешивали многоканальной пипеткой, начиная с ряда с наибольшим разведением сыворотки к ряду с наименьшим разведением. Далее планшет инкубировали 30 мин при 37°C.

Затем содержимое лунок (по 160 мкл из каждой лунки) переносили в белые культуральные

планшеты, содержащие суспензию культуры клеток HEK-293T-hAce2. Процедура проводилась крайне аккуратно, чтобы избежать перекрестной контаминации. Предварительно из белых планшетов удаляли ростовую среду, отбирая ее многоканальными пипетками таким образом, чтобы не открепялись клетки HEK-293T-hAce2.

Закрытые белые планшеты перемещали в CO_2-инкубатор и инкубировали в течение 36–48 ч при стандартных условиях (37°C и 5% CO_2).

По окончании культивирования из лунок планшета многоканальными пипетками отбирали ростовую среду и вносили во все лунки по 40 мкл раствора PBS, нагретого до температуры 20–25°C. Далее во все лунки планшета добавляли по 40 мкл предварительно подготовленного и также нагретого до температуры 20–25°C реагента OneGlo Luciferase assay KIT (Promega, США). Планшеты инкубировали в течение 60–75 мин при комнатной температуре (20–25°C), после чего осуществляли детекцию люминесценции возбуждением в течение 100 мс на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro (Tecan, Швейцария).

Данные значений относительных единиц люминесценции (RLU) контроля вируса и контроля клеток переводили в среднее значение (n = 8), а полученные усредненные данные — в процентное отношение. Протокол принимал за положительное значение (100%) данные, полученные в ряду с вирусным материалом, а за отрицательное значение (0%) — данные, полученные в ряду с контролем клеток.

Данные значений RLU подсчитываются по следующей формуле:

$$\% = \frac{(A - B)}{(B - C)} \times 100$$

где: A – среднее значение RLU образца в определенном разведении, переводимое в %; B — среднее значение RLU отрицательного контроля, соответствующее разведению определяемого значения A; C – среднее значение RLU положительного контроля (контроль вируса), соответствующее разведению определяемого значения A.

Данные обрабатывали в программном обеспечении GraphPad Prism 8.0 посредством построения кривой уровня полумаксимального ингибирования (ID_{50}). Кривые уровня полумаксимального ингибирования определяются четырьмя параметрами: Top (верх), Bottom (низ), HillSlope (наклон сигмоидальной кривой) и ID_{50}. Параметры Top и Bottom описывают значения, при которых кривая выходит на плато — приближаясь бесконечно близко, но никогда не достигая этих значений. HillSlope описывает наклон сигмоидальной кривой между этими двумя плато. ID_{50} относится к концентрации агониста (или антагониста), необходимой для увеличения (или уменьшения) измеренного ответа до половины или до 50% от его максимального значения.

В отношении реакции микронейтрализации с применением псевдовирусных частиц (pMNA) определяется абсолютное значение ID_{50}. Оно представлено концентрацией, вызывающей ответ между контролем (отсутствие антагониста, контроль клеток) и положительным контролем (контроль вируса).

Результаты

На первом этапе работы было необходимо подобрать условия и соотношения всех компонентов реакционной смеси (объем вирусного материала, исследуемой сыворотки). В результате исследований были определены:

- оптимальный сигнальный репортер, используемый при анализе протективной активности исследуемых сывороток;
- время инкубации планшетов при использовании реагента OneGlo;
- схема разведения исследуемых сывороток и схема постановки метода в планшете.
- титр псевдовирусных частиц (подбор рабочей дозы псевдотипированной вирусной конструкции варьировали от разведения 1×10^{-4} до 1×10^{-6}.

Предварительный скрининг сывороток крови для сравнительного анализа был проведен в 2020 г. в начале пандемии, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, с использованием диагностической тест-системы на основе иммуноферментного анализа (ИФА), а также по результатам опроса добровольцев, в ходе которого выяснялось, были ли они вакцинированы или переболели COVID-19. Таким образом были определены положительные и отрицательные образцы сывороток, используемых для разработки методики.

Используя эти образцы, определили сигнальный репортер FLUC (псевдотипированная вирусная конструкция включает данный репортер) ввиду значительно более низкой дельты в сигнале флуоресценции (25 000–45 000 fluorescence units) между исследуемыми образцами, чем при детекции люминесценции (20 000–2 500 000 luminescence units) (рис. 1–2, вклейка, с. I).

На начальных этапах разработки методики для установления применяемого сигнала в качестве вспомогательного, контрольного метода, определяющего правильность постановки реакции, использовали сигнал флуоресценции (гена GFP как репортера).

При наличии сигнала флуоресценции в планшетах допускалось применение реагента OneGlo и детекция люминесценции.

Наибольшие различия в разных сериях экспериментов, проведенных с использованием настоящего подхода, могут быть связаны с разными партиями псевдовирусных частиц. Так как этот компонент характеризуется сложным составом и может незначительно менять свои свойства в зависимости от серии, мы проверили робастность методики с разными сериями вирусных частиц и с репортерами Fluc (люцифераза светлячка) и Nluc (люцифераза креветки).

Из табл. 1 и рис. 2 видно, что использование разных репортеров Nluc и Fluc не приводит к снижению специфичности метода. Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации достигает 100–50% расцениваются как серопозитивные, CV ВНА в значении ID_{50} не превышает 55%, полученные на двух разных репортерах данные сопоставимы.

Параллельно с выбором репортера проходило определение оптимального времени инкубации с реагентом (от 30 до 150 мин).

При инкубации в течение 30 мин сигнал люминесценции был значительно интенсивнее, но данные, преобразованные из относительных единиц люминесценции, были менее корректны и не поддавались интерпретации. Время 60–75 мин было оптимальным по интенсивности RLU, последующее время инкубации снижало сигнал (рис. 3, вклейка, с. I).

Следующей задачей являлось определение схемы разведения исследуемых образцов сывороток, анализируемых в методе. При незначительном разведении исследуемых образцов образовывалось своеобразное плато, которое на графиках представляло собой практически прямую линию.

При шаге разведений до 1:32 исследуемая сыворотка практически во всех разведениях проявляет протективную активность, и определение титра ВНА невозможно. Данные разведения показаны на графике синим.

При шаге разведений до 1:2048 протективная активность сыворотки практически сразу теряется и определение уровня ВНА также не представляется возможным. Данные разведения показаны на графике зеленым.

Наиболее предпочтительной схемой разведения являются разведения от 1:16 до 1:256, при их использовании на графике демонстрируется оптимальная сигмоидальная кривая, поддающаяся интерпретации и корректному определению титра ВНА.

Полученные результаты были обработаны с помощью построения кривой уровня полумаксимального ингибирования (ID_{50}). Данные, представленные на рис. 4 (вклейка, с. I), подтверждают выводы, полученные в ходе постановки реакции при использовании разных разведений.

Используемое разведение псевдовирусных частиц, применяемое в качестве рабочей дозы, также влияет на взаимодействие с антителами. При внесении большего объема вирусного материала даже значительное количество антител в образце не сможет заблокировать все участки спайкового белка на поверхности вируса, однако при внесении меньшего объема псевдовируса наблюдается обратный эффект. При подборе оптимальной рабочей дозы псевдовирусной конструкции мы ориентировались на титр активности частиц, определенный в компетентных к вирусу клетках, и использовали разведения от 1×10^{-3} до 1×10^{-6}.

В два ряда планшета последовательно вносились по 24 мкл псевдовируса в каждую лунку восьмиканальным дозатором (рабочее разведение вируса 1×10^{-3}, или 100 000 вирусных частиц на лунку; рабочее разведение вируса 1×10^{-4}, или 10 000 вирусных частиц на лунку; рабочее разведение вируса 1×10^{-5}, или 1000 вирусных частиц на лунку и рабочее разведение вируса 1×10^{-6}, или 100 вирусных частиц на лунку), предварительно разведя псевдовирус средой DMEM F12 D8900 + 2% FBS в 4, 8 и 16 раз соответственно.

Применение рабочей дозы псевдовирусных частиц 1×10^{-4} (рис. 5, вклейка, с. II) наиболее эффективно при постановке реакции, так как именно с применением этого разведения получаются наиболее четкие данные с минимальным количеством выбитых точек; при увеличении разведения рабочей дозы наблюдается значительное снижение точности метода и полученные данные не поддаются дальнейшей интерпретации.

Значения исследуемых образцов сыворотки (стандартная схема постановки), используемые в дальнейшем для сравнения метода ИФА с детекцией через 60 мин, представлены на рис. 6 (вклейка, с. II).

Сравнение результатов, полученных при постановке образцов в реакции нейтрализации, и результатов, полученных методом иммуноферментного анализа (SARS-CoV-2 IgG (количественный) «ИФА Бест», кат. № D5505, Lot № 3, годен до), представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что результаты, полученные при постановке образцов в реакции нейтрализации и методом иммуноферментного анализа, имеют лишь умеренную корреляцию в образцах переболевших добровольцев.

Это связано с тем, что метод ИФА направлен на определение в сыворотке крови добровольцев пула антител, сформированных на пептиды S, M, N и белки вириона SARS-CoV-2, поэтому даже высокое значение BAU/ml не гарантирует надлежащей защиты от инфицирования [12].

Метод pMNA направлен на взаимодействие ВНА непосредственно со спайковым белком

Таблица 1. Оценка робастности методики при постановке реакции с использованием разных репортеров Nluc и Fluc в исследовании серопозитивных сывороток

Table 1. Evaluation of method robustness using different Nluc and Fluc reporters in the study of seropositive sera

№ образца Sample	Репортер Nluc Reporter Nluc		Репортер Fluc Repoter Fluc		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}
33	2,141	138,3	2,076	119,1	2,108	128,7	0,032	9,6	1,54	7,45
73	3,033	1079,0	3,138	1374,0	3,085	1226,5	0,052	147,5	1,70	12,02
72	2,932	854,8	3,007	1017,0	2,969	935,9	0,037	81,1	1,26	8,66
71	2,426	266,8	2,475	298,5	2,450	282,6	0,024	15,8	0,99	5,60
76	2,165	146,2	2,364	231,2	2,264	188,7	0,099	42,5	4,39	22,52
75	1,997	99,2	2,216	164,6	2,106	131,9	0,109	32,6	5,19	24,77
67	2,949	888,4	2,946	882,4	2,947	885,4	0,001	3,0	0,05	0,33
114	2,237	172,6	2,224	167,6	2,230	170,1	0,006	2,5	0,29	1,46
121	2,596	394,4	2,623	419,9	2,609	407,1	0,013	12,7	0,51	3,13

SARS-CoV-2, так как только этот участок встроен в оболочку псевдотипированных вирусных частиц, используемых при постановке, и является составной частью рекомбинантных векторных вакцин.

Поэтому именно метод pMNA является наиболее предпочтительным при оценке протективной защиты вакцин, применяемых в профилактике COVID-19.

На втором этапе по результатам разработки метода определения ВНА было проведено лабораторное исследование, оценивающее пригодность методики, позволяющей определить наличие специфических к антигену SARS-CoV-2 ВНА в сыворотке крови добровольцев, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и/или иммунизированных препаратами специфической профилактики COVID-19, здоровых (не болевших и не иммунизированных) в реакции нейтрализации на культуре клеток HEK 293-T-hAce2 с применением псевдовирусных частиц.

Полнота нейтрализации представляет собой показатель, обратный процентному отношению сигнала люминесценции. При полноте инактивации в 100% значение RLU соответствует 0% и наоборот.

Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации не достигала 50%, расценивались как серонегативные. Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации достигала 100–50%, расценивались как серопозитивные. Так как в результате вакцинации, равно как и в процессе естественной инфекции, вырабатываются ВНА к вирусу SARS-CoV-2, сыворотки вакцинированных и переболевших людей обладают вируснейтрализующей активностью. Необходимо отметить, что под вакцинированными в настоящем исследовании понимаются люди, получавшие дозу векторной назальной вакцины, блокирующей S-белок вируса SARS-CoV-2. В случае нулевой или низкой концентрации нейтрализующих антител в исследуемом разведении анализируемой сыворотки значения нейтрализации могут быть более 100%, что является следствием стабилизации вирусных частиц сывороточными белками и приводит к более эффективной трансдукции клеток, чем в отрицательном контроле без сывороток.

Специфичность. Специфичность — это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов. Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава. Образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации не достигает 50% расцениваются, как серонегативные. В настоящем исследовании в качестве критерия специфичности принималась способность методики различать образцы, характеризующиеся способностью/неспособностью нейтрализовать SARS-CoV-2, и образцы от доноров, заведомо наивных по инфекции SARS-CoV-2.

Из табл. 3 и рис. 7 (вклейка, с. II) видно, что образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации достигает 100–50%, обладают значением ID_{50} более 50 единиц и расцениваются как серопозитивные.

Из табл. 4 видно, что образцы, в которых в первом разведении сыворотки полнота нейтрализации не более 50%, и которые обладают значением ID_{50} менее 50 единиц, расцениваются как серонегативные. Специфичность методики была подтверждена.

Таблица 2. Результаты, полученные при постановке образцов в реакции нейтрализации и методом иммуноферментного анализа

Table 2. Results obtained using neutralization reaction and ELISA

№ образца Sample	Статус Status	Результат pMNA ($LogIC_{50}$) pMNA ($LogIC_{50}$)	Результат ИФАБест (BAU/ml) IFABest (BAU/ml)
001-А (A)	**Вакцинирован**/Vaccinated	2,786	535,726
002-Б (B)	**Вакцинирован**/Vaccinated	3,067	170,593
003-В (C)	**Вакцинирован**/Vaccinated	3,158	90,472
004-Г (D)	**Вакцинирован**/Vaccinated	2,605	842,665
005-Д (E)	**Вакцинирован**/Vaccinated	3,321	116,691
006-Е (F)	**Вакцинирован**/Vaccinated	3,211	43,608
007-Ж (G)	**Вакцинирован**/Переболел **Vaccinated**/Has been ill	4,099	701,349
КОЛ (KOL)	**Вакцинирован**/Переболел **Vaccinated**/Has been ill	3,540	729,553

Примечание. < 10,0 BAU/мл — отрицательный (антител нет); ≥ 10,0 BAU/мл — положительный (антитела есть); при 11–79 BAU/мл = вируснейтрализующий эффект низкий (принятие решения по вакцинации); при 80–149,9 BAU/мл = вируснейтрализующий эффект действует только в 50% случаев (контроль в динамике); при > 150 BAU/мл = вируснейтрализующая активность ярко выражена в 100% случаев (достаточный уровень для защиты, вакцинация не требуется); при 500 и выше = выработан максимальный уровень антител (вакцинация не требуется).

Note. < 10.0 BAU/ml — negative (no antibodies); ≥ 10.0 BAU/ml — positive (with antibodies); at 11–79 BAU/ml = low virus neutralization effect (vaccination decision); at 80–149.9 BAU/ml = virus-neutralizing effect is effective only in 50% of cases (time-dependent control); at > 150 BAU/ml = virus-neutralizing activity is prominent in 100% of cases (sufficient level for protection, vaccination is not required); at 500 and above = the maximum level of antibodies has been developed (vaccination is not required).

Повторяемость (сходимость). Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях (одна серия псевдовирусных частиц с одним репортером FLUC, один оператор) в пределах короткого промежутка времени.

Данные, представленные в табл. 5 и на рис. 8 (вклейка, с. III), свидетельствуют о соответствии полученных результатов критериям приемлемости методики. Повторяемость аналитической методики, исходя из полученных в одинаковых условиях данных (при использовании одной серии псевдовирусных частиц с одним репортером FLUC, один оператор), проанализирована по критериям: стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD). Для одного образца у одного оператора в трех повторах коэффициент вариации для значений ВНА ID_{50} не превышал 55%. Повторяемость методики была подтверждена.

Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (один батч псевдовирусных частиц с одним репортером FLUC, три оператора).

Из табл. 6 и рис. 9 (вклейка, с. III) видно, что внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики, исходя из полученных в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории результатов, соответствует критериям приемлемости методики: CV ВНА в значении ID_{50} не превышает 55%. Прецизионность методики была подтверждена.

Табл. 7 и рис. 10 (вклейка, с. III) демонстрируют, что применение одного репортера разных серий, используемых при сборке псевдотипированной конструкции, не приводит к снижению устойчивости метода: CV ВНА в значении ID_{50} не превышает 55%, что соответствует критериям приемлемости методики. Робастность методики была подтверждена.

Линейность. Линейность методики — это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. В диапазоне детекции должна наблюдаться линейность при сопоставлении расчетного ID_{50} и измеренного ID_{50}. Меру линейности определяют, откладывая на графике точки $\log_2$ (ID_{50}) от $\log_2$ (кратность разведения) и находя R^2 при линейной регрессии (функция $y = kx + c$). За допустимый уровень линейности принят такой, при котором $R^2 > 0,9$.

Рис. 11 и 12 (вклейка, с. IV) показывают наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации ВНА в анализируемых сыворотках крови добровольцев в пределах аналитической области методики, что подтверждает значение R^2, не превышающее 0,9. Линейность методики подтверждена при значении $R^2 > 0,9$.

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468)
(1-й фрагмент; продолжение см. на с. II)

Illustrations for the article "Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction" (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (1st fragment; continued on p. II)

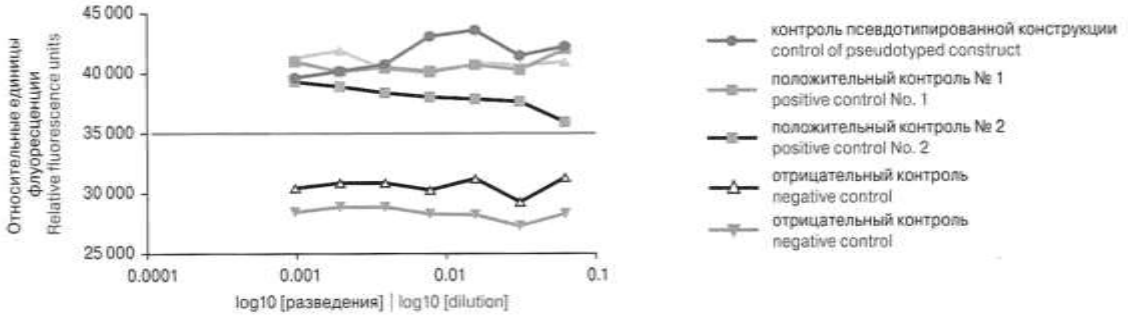


Рисунок 1. Детекция флуоресценции

Figure 1. Negative controls

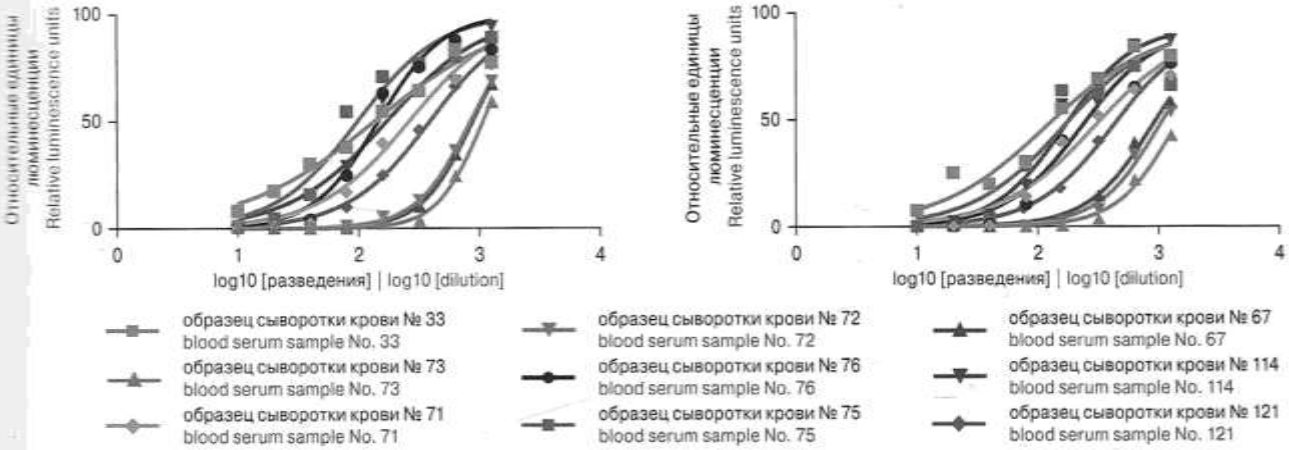


Рисунок 2. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения с использованием репортера Nluc (левый график) и Fluc (правый график)

Figure 2. RLU signal versus logarithm of dilution for Nluc (left plot) and Fluc (right plot) reporter

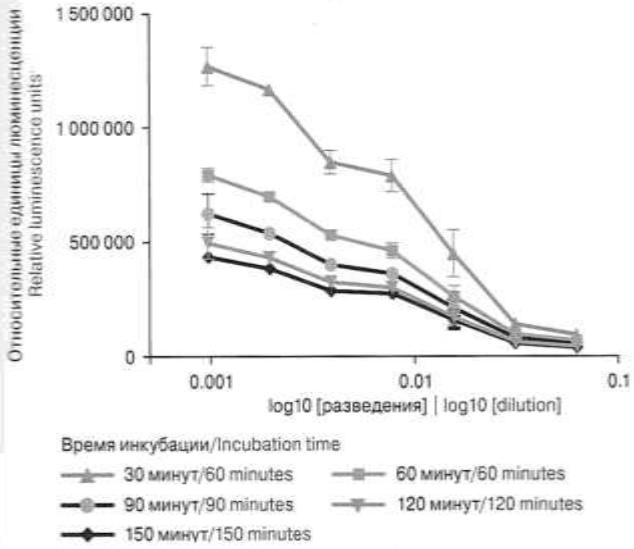


Рисунок 3. Инкубация образца с реагентом OneGlo

Figure 3. A sample incubated with OneGlo reagent

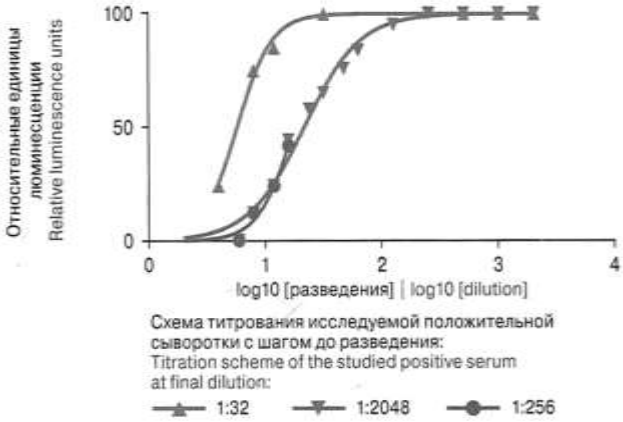
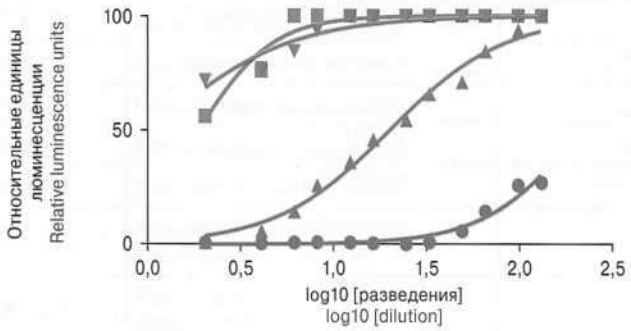


Рисунок 4. Итоговые значения исследуемых образцов сыворотки с детекцией через 60 минут

Figure 4. Summarized data on the studied serum samples by detection after 60-minute incubation

***Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса»* (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468)**
(2-й фрагмент; начало см. на с. I; продолжение см. на с. III)

Illustrations for the article "Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction" (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (2nd fragment; start on p. I, continued on p. III)



	10^3	10^4	10^5	10^6
LogIC50	2.320	1.292	0.02477	0.2690
HillSlope	1.694	1.413	1.217	2.202
IC50	208.7	19.57	1.059	1.858

Рабочее разведение вируса
Working dilution of the virus

- 1×10^{-3} или 100 000 вирусных частиц на лунку / 1×10^{-3} or 100 000 virus particles per well
- 1×10^{-4} или 10 000 вирусных частиц на лунку / 1×10^{-4} or 10 000 virus particles per well
- 1×10^{-5} или 1000 вирусных частиц на лунку / 1×10^{-5} or 1000 virus particles per well
- 1×10^{-6} или 100 вирусных частиц на лунку / 1×10^{-6} or 100 virus particles per well

Рисунок 5. Результаты интерпретации титра nAb в сыворотке крови с применением рабочей дозы псевдовирусных частиц

Figure 5. nAb titer interpretation in blood serum using a working dose of pseudoviral particles depicted as follows

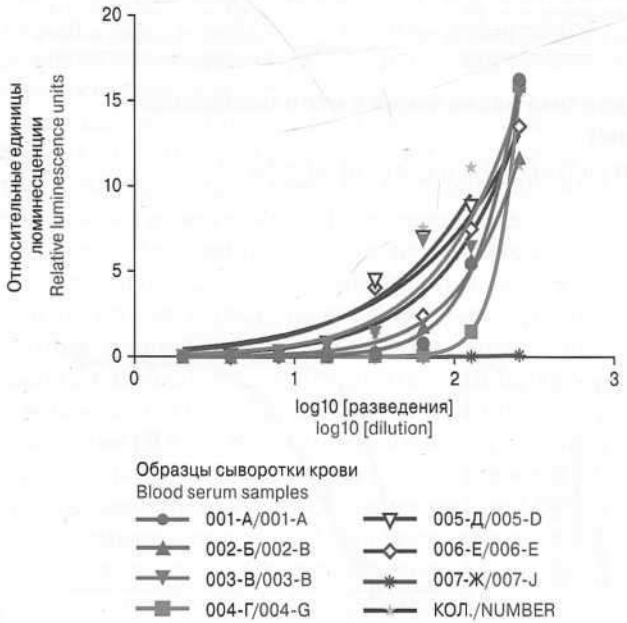


Рисунок 6. Результаты интерпретации титра вируснейтрализующих антител в сыворотке с применением рабочей дозы псевдовирусных частиц 1×10^{-4}

Figure 6. Interpretation of virus-neutralizing antibody titer in serum using a working dose of pseudoviral particles 1×10^{-4}

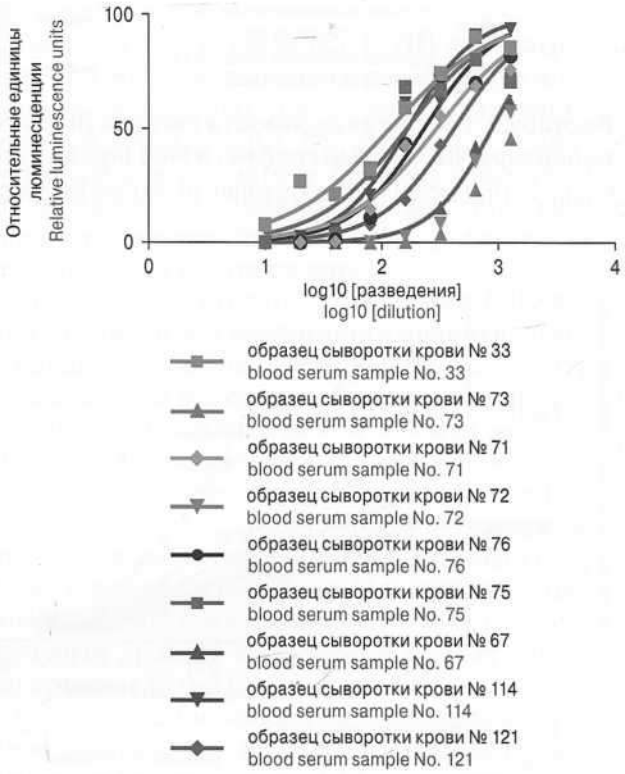


Рисунок 7. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения

Figure 7. RLU signal versus log dilution

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468)
(3-й фрагмент; начало см. на с. I–II; окончание см. на с. IV)

Illustrations for the article "Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction" (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (3rd fragment; start on p. I–II, continued on p. IV)

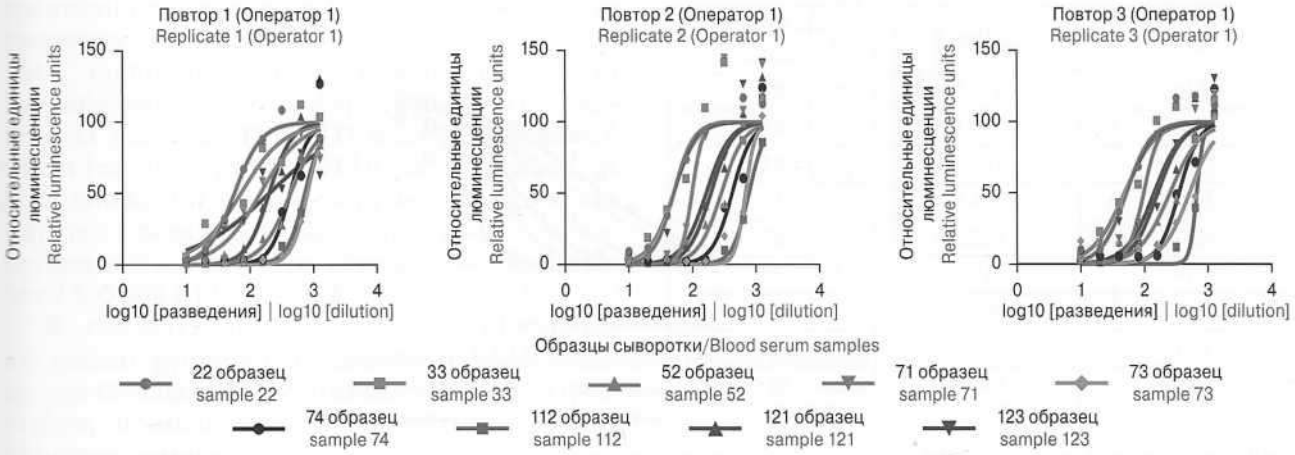


Рисунок 8. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения (технические повторы, выполненные одним оператором)

Figure 8. RLU signal versus logarithm of dilution (one-operator technical replicates)

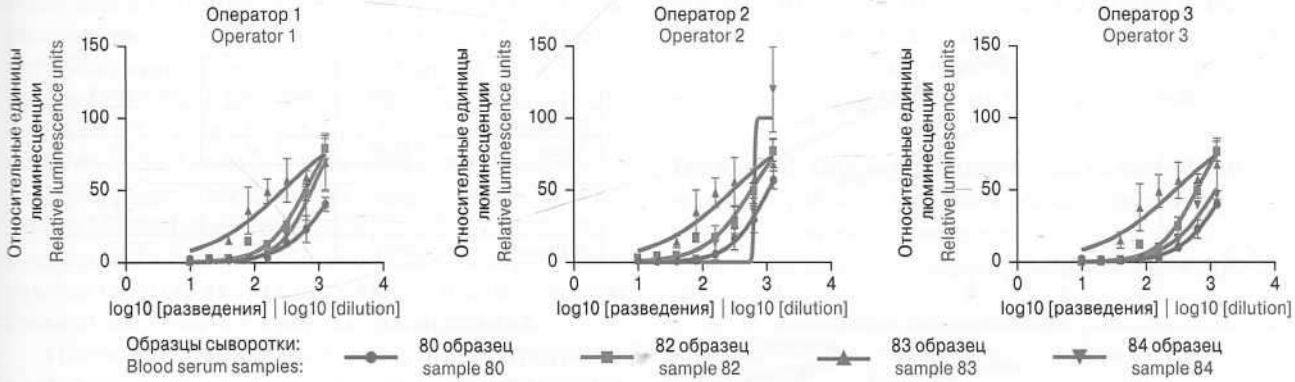


Рисунок 9. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения

Figure 9. RLU signal versus log dilution

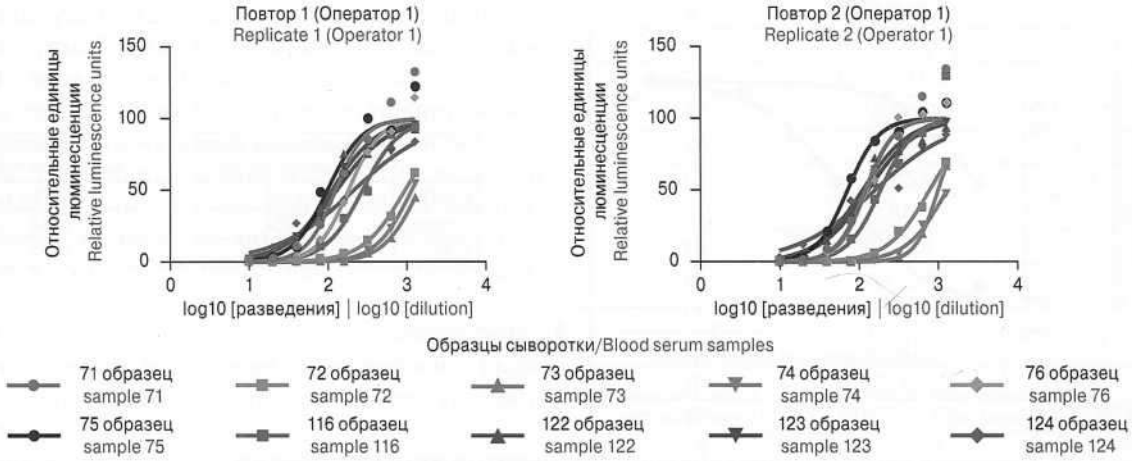


Рисунок 10. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения с использованием репортера Nluc (Партии 1–2)

Figure 10. RLU signal versus logarithm of dilution using the Nluc reporter (Lot 1–2)

Иллюстрации к статье «Оценка уровня вируснейтрализующих антител, индуцированных новой коронавирусной инфекцией COVID-19: разработка анализа быстрой оценки протективных антител с использованием реакции на основе псевдовируса» (авторы: А.А. Фунтиков, Н.А. Литвинова, Е.В. Зуев, С.В. Кулемзин, Р.Р. Шукуров) (с. 457–468) (4-й фрагмент; начало см. на с. I–III)

Illustrations for the article "Evaluation of virus-neutralizing antibody level after novel coronavirus infection COVID-19: development of an instant assay assessing protective antibodies using a pseudovirus-based reaction" (authors: Funtikov A.A., Litvinova N.A., Zuev E.V., Kulemzin S.V., Shukurov R.R.) (pp. 457–468) (4th fragment; start on p. I–III)

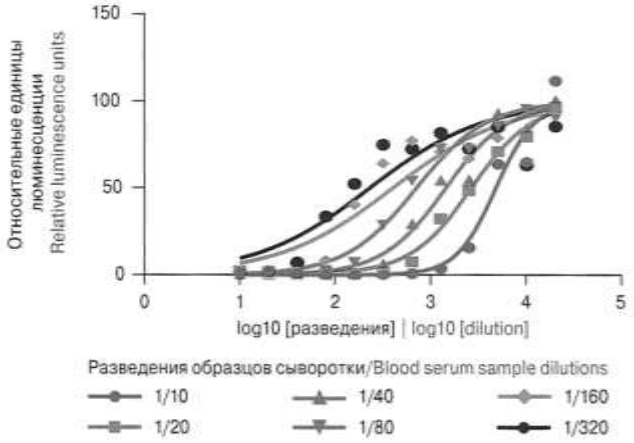
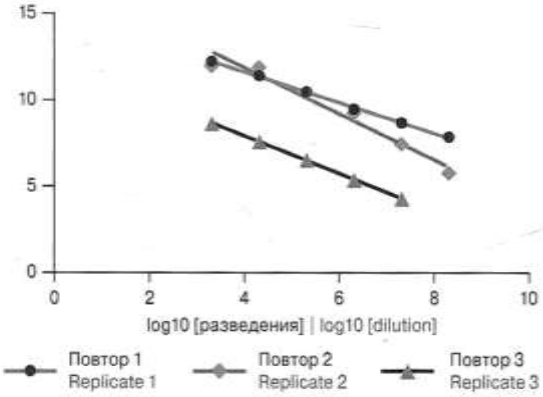


Рисунок 11. Первичные данные, полученные для обработки линейности. График зависимости сигнала RLU от логарифма разведения

Figure 11. Raw data obtained for linearity processing. RLU signal versus logarithm of dilution

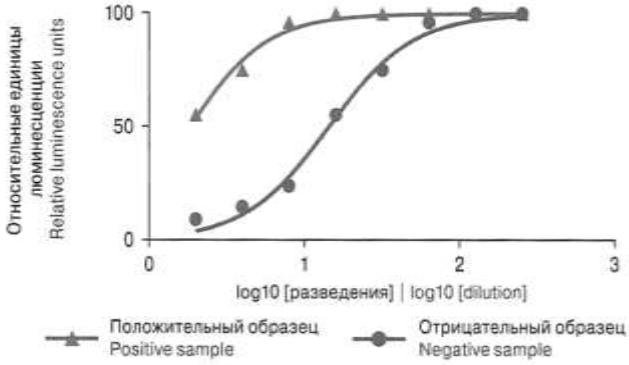


	Повтор 1 Replicate 1	Повтор 2 Replicate 2	Повтор 3 Replicate 3
YIntercept	15.21	12.30	17.06
Slope	−0.8888	−1.091	−1.307

	Повтор 1 Replicate 1	Повтор 2 Replicate 2	Повтор 3 Replicate 3
R-squared	0.9987	0.9997	0.9587

Рисунок 12. Графики точки log_2 (ID_{50}) от log_2 (кратность разведения)

Figure 12. Log_2 point (ID_{50}) versus log_2 (dilution factor)



	Положительный образец Positive sample	Отрицательный образец Negative sample
LogIC50	1.159	0.2606
HillSlope	1.604	1.714
IC50	14.41	1.822

Рисунок 13. Типичные кривые нейтрализации, ожидаемые от pMNA

Figure 13. Representative pMNA-related neutralization curves

Обсуждение

По результатам первой постановки было показано, что ВНА, содержащиеся в исследуемых положительных сыворотках, способны к нейтрализации спайкового белка на поверхности применяемых псевдовирусных частиц. Тем самым, проникновения псевдовируса в клетку за счет взаимодействия фермента ACE2 с S-белком на клетках HEK-293T-hAce2 не происходит и ген люциферазы FLUC не встраивается. При снижении уровня вируснейтрализующих антител в образцах повышается уровень люминесценции исследуемых образцов — сигнал более 2 500 000 RLU.

В последующих постановках применялся только репортер люциферазы FLUC ввиду значительно более низкой стоимости реагентов, применяемых при детекции сигнала люминесценции.

Было установлено, что оптимальное время инкубации планшета после внесения реагента OneGlo Promega (определяющего наличие люциферазы FLUC) — 60–75 мин. При таком сроке инкубации определялось максимальное количество люциферазы в лунке. Краситель распределялся равномерно, что препятствовало гетерогенности результатов. При этом в течение указанного времени определялось значительное для детекции количество люциферазы в лунке (1,5–2 млн единиц люминесценции).

При схеме постановки, использующей высокие разведения (до разведения 1:2048), исследуемые образцы практически сразу теряли протективную активность ввиду значительного снижения антител в первых разведениях.

Наиболее применимыми в интерпретации результатов исследования сывороток являлись двукратные разведения образца до разведения 1:256. На рис. 4 показано, что исследуемый образец корректно титруется именно при данной схеме разведения, образуя оптимальную сигмоидальную кривую и демонстрирует наличие в исследуемой сыворотке ВНА. При использовании схемы разведения до 1:32 показано, что исследуемый образец титруется некорректно, что демонстрирует характерная сигмоидальная кривая. При использовании схемы разведения до 1:2048 сигмоидальная кривая была выставлена более корректно, но пороговое значение определялось менее точно ввиду больших шагов разведения.

По результатам определения объемов реакционной смеси и подбора всех условий была разработана стандартная схема постановки метода.

Хорошей практикой является отслеживание критических параметров с использованием таблиц тенденций и сводных таблиц анализа результатов, которые могут указать, где произошли изменения в характеристиках анализа.

Таблица 3. Оценка специфичности методики при постановке реакции в исследовании серопозитивных сывороток

Table 3. Evaluated technique specificity in seropositive sera examined

№ образца Sample	$LogID_{50}$	ID_{50}
33	2,076	119,1
73	3,138	1374,0
72	3,007	1017,0
71	2,475	298,5
76	2,364	231,2
75	2,216	164,6
67	2,946	882,4
114	2,224	167,6
121	2,623	419,9

Пример ненейтрализующей и сильно нейтрализующей сыворотки приведен на рис. 13 (вклейка, с. IV).

Исходя из полученных данных было сделано заключение, что ВНА, содержащиеся в исследуемых положительных сыворотках, способны к нейтрализации спайкового белка на поверхности применяемых псевдовирусных частиц.

Таблица 4. Оценка специфичности методики при постановке реакции в исследовании серонегативных сывороток

Table 4. Evaluated technique specificity in seronegative sera examined

№ образца Sample	$LogID_{50}$	ID_{50}
1	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
2	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
3	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
4	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
5	0,849	7,063
6	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
7	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
8	~ 0,9640	~ 9,205
9	0,8336	6,817
10	~ 0,9534	~ 8,982
11	1,843	69,72
12	0,5122	3,253
13	3,25	1779
14	НПКО (LOQ)	НПКО
15	0,5818	3,818
16	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
17	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)
18	~ 0,9853	~ 9,666
19	1,056	11,38
20	НПКО (LOQ)	НПКО (LOQ)

Таблица 5. Оценка повторяемости (сходимости) методики при постановке реакции одним оператором

Table 5. Evaluated of a single-operator method repeatability (convergence)

№ образца Sample	Повтор 1 (Оператор 1) Repeat 1 (Operator 1)		Повтор 2 (Оператор 1) Repeat 2 (Operator 1)		Повтор 3 (Оператор 1) Repeat 3 (Operator 1)		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}
22/2	1,756	57,1	1,706	50,8	1,716	52,1	1,726	53,3	0,021	2,7	1,25	5,09
33/2	1,867	73,7	1,707	50,9	1,694	49,4	1,756	58,0	0,078	11,1	4,47	19,16
52/4	2,637	433,4	2,452	283,1	2,405	253,9	2,498	323,4	0,101	78,6	4,01	24,31
71/2	2,166	146,6	1,995	98,8	1,991	98,0	2,050	114,4	0,081	22,7	3,97	19,85
73/2	2,907	807,2	2,843	697,2	2,719	523,6	2,823	676,0	0,078	116,7	2,76	17,27
74/2	2,631	427,5	2,627	423,8	2,547	352,7	2,602	401,3	0,039	34,4	1,49	8,58
112/4	2,866	734,4	2,895	784,8	2,829	674,7	2,863	731,3	0,027	45,0	0,94	6,15
121/2	2,304	201,2	2,289	194,5	2,214	163,5	2,269	186,4	0,039	16,4	1,74	8,81
123/2	2,307	202,9	2,218	165,4	2,158	144,0	2,227	170,7	0,061	24,3	2,74	14,25

Таблица 6. Оценка промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики при постановке реакции тремя операторами

Table 6. Evaluated three-operator intermediate (intralaboratory) method precision

№ образца Sample	Оператор 1 Operator 1		Оператор 2 Operator 2		Оператор 3 Operator 3		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}
80	3,256	1803,0	3,034	1082,0	3,237	1725,0	3,176	1536,7	0,100	323,1	3,16	21,02
82	2,795	623,3	2,774	594,5	2,798	627,7	2,789	615,2	0,011	14,7	0,38	2,39
83	2,440	275,1	2,474	298,1	2,452	283,2	2,455	285,5	0,014	9,5	0,57	3,34
84	2,894	783,4	2,814	652,0	3,092	1236,0	2,993	1009,7	0,099	226,3	3,31	22,41

Таблица 7. Оценка специфичности методики при постановке реакции с использованием репортера Nluc разных серий, используемых при сборке псевдотипированной конструкции

Table 7. Evaluated method specificity using the Nluc reporter of different series in assembly of the pseudotyped construct

№ образца Sample	Репортер Nluc (Партия 1) Nluc Reporter (lot 1)		Репортер Nluc (Партия 2) Nluc Reporter (lot 2)		Среднее значение Average		Стандартное отклонение Standard deviation		CV, %	
	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}	$LogID_{50}$	ID_{50}
71	2,099	125,6	2,083	121,0	2,091	105,9	0,008	24,7	0,38	23,36
72	2,901	796,3	2,984	963,7	2,942	880	0,041	83,7	1,41	9,51
73	3,004	1010,0	3,153	1421,0	3,078	1215,5	0,074	205,5	2,42	16,91
74	3,120	1319,0	3,067	1166,0	3,093	1242,5	0,026	76,5	0,86	6,16
76	2,102	126,4	2,265	184,0	2,183	155,2	0,081	28,8	3,73	18,56
75	1,856	71,7	1,989	97,5	1,922	84,6	0,066	12,8	3,46	15,22
116	2,277	189,3	2,440	275,2	2,358	232,2	0,081	42,9	3,46	18,49
122	2,050	112,3	2,052	112,7	2,051	115,7	0,001	4,5	0,05	3,87
123	2,110	128,8	2,117	130,8	2,114	127,5	0,004	3,3	0,17	2,59
124	2,208	161,4	2,328	213,0	2,268	187,2	0,060	25,8	2,65	13,78

Определен оптимальный титр рабочей дозы псевдовирусных частиц, равный 1×10^{-4}. Представленная рабочая доза позволяет наиболее корректно определять наличие ВНА в образцах сыворотки крови.

Заключение

Нейтрализующая реактивность, вызванная естественной инфекцией с последующей вакцинацией, все больше ослабляется недавним появлением новых вирусных штаммов SARS-CoV-2 (Eta (lineage B.1.525), Kappa (lineage B.1.617.1), Mu (lineage B.1.621)). Хотя иммунная защита, сформированная препаратами специфической профилактики SARS-CoV-2 в популяции, в целом обеспечивает надлежащую протективную защиту, в дальнейшем может потребоваться доработка новых вакцинных препаратов для создания у населения перекрестного иммунитета к новым штаммам.

Данные уровня протективной активности исследуемых сывороток, полученные с помощью разработанной методики, подтверждают индукцию специфических антител у большинства добровольцев, при этом иммунный ответ у иммунизированных субъектов иногда более сильный, чем у ранее инфицированных добровольцев, что, как следствие, подтверждает необходимость вакцинации.

Вируснейтрализующие антитела, содержащиеся в исследуемых положительных сыворотках в разведениях с 1:16 до 1:64, способны к нейтрализации спайкового белка на поверхности применяемых псевдовирусных частиц.

Следует учитывать, что метод оценки ВНА с использованием реакции на основе псевдовируса, учитывая дороговизну и трудоемкость, больше используется для аналитических, научных целей и периодического подтверждения результатов других скрининговых методов (ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay, IGRA — Interferon-γ release assays).

Разработанная нами методика позволяет определять наличие вирусспецифических к антигену SARS-CoV-2 ВНА в сыворотке крови лиц, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и/или иммунизированных препаратами специфической профилактики здоровых добровольцев в реакции нейтрализации с применением псевдотипированных вирусных конструкций на основе вируса иммунодефицита человека.

Список литературы/References

1. Beeching N.J., Fletcher T.E., Fowler R. Coronavirus Disease (COVID-19). *BMJ Best Practices. URL: http://www.hpruezi.nihr.ac.uk/publications/2020/bmj-best-practice-coronavirus-disease-covid-19 (23.01.2023)*
2. Campi-Azevedo A.C., Peruhype-Magalhães V., Coelho-Dos-Reis J.G., Antonelli L.R., Costa-Pereira C., Speziali E., Reis L.R., Lemos J.A., Ribeiro J.G.L., Bastos Camacho L.A., de Sousa Maia M.L., Barbosa de Lima S.M., Simões M., de Menezes Martins R., Homma A., Cota Malaquias L.C., Tauil P.L., Costa Vasconcelos P.F., Martins Romano A.P., Domingues C.M., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A.; Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. 17DD yellow fever revaccination and heightened long-term immunity in populations of disease-endemic areas, Brazil. *Emerg. Infect. Dis., 2019, vol. 25, no. 8, pp. 1511–1521. doi: 10.3201/eid2508.181432*
3. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y., Chen Z., Guo Y., Zhang J., Li Y., Song X., Chen Y., Xia L., Fu L., Hou L., Xu J., Yu C., Li J., Zhou Q., Chen W. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science, 2020, vol. 369, no. 6504, pp. 650–655. doi: 10.1126/science.abc6952*
4. Cohen B.J., Audet S., Andrews N., Beeler J.; WHO working group on measles plaque reduction neutralization test. Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination. *Vaccine, 2007, vol. 26, no. 1, pp. 59–66. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.10.046*
5. Cohen B.J., Doblas D., Andrews N. Comparison of plaque reduction neutralisation test (PRNT) and measles virus-specific IgG ELISA for assessing immunogenicity of measles vaccination. *Vaccine, 2008, vol. 26, no. 50, pp. 6392–6397. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.074*
6. Duong D. Alpha, Beta, Delta, Gamma: What's important to know about SARS-CoV-2 variants of concern? *CMAJ, 2021, vol. 193, no. 27, pp. E1059-E1060. doi: 10.1503/cmaj.1095949*
7. Eyal O., Olshevsky U., Lustig S., Paran N., Halevy M., Schneider P., Zomber G., Fuchs P. Development of a tissue-culture-based enzyme-immunoassay method for the quantitation of anti-vaccinia-neutralizing antibodies in human sera. *J. Virol. Methods, 2005, vol. 130, no. 1–2, pp. 15–21. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.027*
8. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueroa A., Guo X.V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.Y., Kwong P.D., Sodroski J.G., Yin M.T., Sheng Z., Huang Y., Shapiro L., Ho D.D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 450–456. doi: 10.1038/s41586-020-2571-7*
9. Nie J., Li Q., Wu J., Zhao C., Hao H., Liu H., Zhang L., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Sun Q., Liu J., Fan C., Huang W., Xu M., Wang Y. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. *Nat. Protoc., 2020, vol. 15, no. 11, pp. 3699–3715. doi: 10.1038/s41596-020-0394-5*
10. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., Limbo O., Smith C., Song G., Woehl J., Yang L., Abbott R.K., Callaghan S., Garcia E., Hurtado J., Parren M., Peng L., Ramirez S., Ricketts J., Ricciardi M.J., Rawlings S.A., Wu N.C.,

Yuan M., Smith D.M., Nemazee D., Teijaro J.R., Voss J.E., Wilson I.A., Andrabi R., Briney B., Landais E., Sok D., Jardine J.G., Burton D.R. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science, 2020, vol. 369, no. 6506, pp. 956–963. doi: 10.1126/science.abc7520*

11. Tang X., Wu C., Li X., Song Y., Yao X., Wu X., Duan Y., Zhang H., Wang Y., Qian Z., Cui J., Lu J. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci. Rev., 2020, vol. 7, no. 6, pp. 1012–1023. doi: 10.1093/nsr/nwaa036*
12. Yun S., Ryu J.H., Jang J.H., Bae H., Yoo S.H., Choi A.R., Jo S.J., Lim J., Lee J., Ryu H., Cho S.Y., Lee D.G., Lee J., Kim S.C., Park Y.J., Lee H., Oh E.J. Comparison of SARS-CoV-2 antibody responses and seroconversion in COVID-19 patients using twelve commercial immunoassays. *Ann. Lab. Med., 2021, vol. 41, no. 6, pp. 577–587. doi: 10.3343/alm.2021.41.6.577*
13. Zhao H., Zhu Q., Zhang C., Li J., Wei M., Qin Y., Chen G., Wang K., Yu J., Wu Z., Chen X., Wang G. Tocilizumab combined with favipiravir in the treatment of COVID-19: a multicenter trial in a small sample size. *Biomed. Pharmacother., 2021, vol. 133: 110825. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110825*

Авторы:

Фунтиков А.А., к.в.н., научный сотрудник АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Литвинова Н.А., к.б.н., руководитель отдела АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Зуев Е.В., старший научный сотрудник АО «ГЕНЕРИУМ» , Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

Кулемзин С.В., к.б.н., научный сотрудник ООО «ИМГЕН+», г. Новосибирск, Россия;

Шукуров Р.Р., к.б.н., директор департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия.

Authors:

Funtikov A.A., PhD (Veterinary), Researcher, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Litvinova N.A., PhD (Biology), Head of Department, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Zuev E.V., Senior Researcher, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

Kulemzin S.V., PhD (Biology), Researcher, LLC "IMGEN+", Novosibirsk, Russian Federation;

Shukurov R.R., PhD (Biology), Director of the Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.02.2023
Отправлена на доработку 19.03.2023
Принята к печати 02.05.2023

Received 06.02.2023
Revision received 19.03.2023
Accepted 02.05.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 469–480

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 469–480

АНАЛИЗ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ «СПУТНИК V» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ

С.П. Казаков[1,3], Д.В. Решетняк[1], Н.В. Давыдова[1], О.А. Ефимушкина[2], С.Б. Путков[1]

[1] *ФГБУ Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко Министерства обороны России, Москва, Россия*
[2] *ГБУЗ Диагностический клинический центр № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия*
[3] *ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

Резюме. Современные методы вакцинопрофилактики подтвердили свою высокую эффективность в борьбе с пандемией новой коронавирусной инфекции. Однако использование различных типов вакцин требует изучения эффективности поствакцинального иммунного ответа (ПИО), прежде всего — оценки специфичности и количества выработки антител к поверхностным и внутренним антигенам вируса SARS-CoV-2, в частности, после применения наиболее перспективной отечественной вакцины «Гам-Ковид-Вак» («Спутник V»). Также необходимой является и оценка диагностической эффективности применяемых для этого лабораторных методов. Для оценки эффективности ПИО были исследованы образцы биоматериала (сыворотки крови), полученные на 22–25 сутки после введения второго компонента вакцины от 202 вакцинированных «Спутник V», ранее не иммунизированных, не имевших антител к SARS-CoV-2 до вакцинации. Были определены уровни антител классов IgG и IgM к поверхностным и нуклеокапсидному антигенам вируса SARS-CoV-2 при помощи полуколичественных и количественных методов на наборах реагентов отечественных и зарубежных производителей. Для оценки диагностической эффективности методов были проведены: сравнительный анализ специфичности и чувствительности всех использованных лабораторных методов; оценка корреляции результатов для количественных методов (с использованием коэффициента корреляции по Спирмену) в отношении специфических антител к полноформатному тримеризованному S-белку и рецептор-связывающему домену S-белка SARS-CoV-2. В ходе исследования определено, что все использованные наборы реагентов для обнаружения антител IgG к S-белку и к RBD S-белка SARS-CoV-2 показали максимальную (100%) специфичность на достаточном количестве испытуемых (от 186 до 202 образцов). Соответствие результатов специфичности как для полуколичественного и количественного ИФА, так и для двух ИХЛА тест-систем, по качественной характеристике («положительно»—«отрицательно») также было близко к максимальным значениям (98,4–99,4%) с высоким уровнем сопоставимости. Поствакцинальный иммунный ответ при вакцинации «Спутник V» в отношении выработки специфических антител IgG наблюдался у 98,9% всех вакцинированных. Изучены диапазоны уровней антител IgG с определением их «защитного» уровня. Представлены данные о том, что «защитный» уровень бо-

Адрес для переписки:
Казаков Сергей Петрович
105094, Россия, Москва, Госпитальная пл., 3,
ФГБУ ГВКГ им. Н.Н. Бурденко Минобороны России.
Тел./факс: 8 (499) 263-01-73 (служебн.).
Тел.: 8 977 726-46-94 (моб.).
E-mail: gvkg.ckld@mail.ru; rmapo.kafimm@mail.ru

Contacts:
Sergei P. Kazakov
105094, Russian Federation, Moscow, Gospitalnaya sq., 3,
Main Military Clinical Hospital named after
academician N.N. Burdenko Russian Defense Ministry.
Phone/fax:+7 (499) 263-01-73 (office).
Phone: +7 977 726-46-94 (mobile).
E-mail: gvkg.ckld@mail.ru; rmapo.kafimm@mail.ru

Для цитирования:
Казаков С.П., Решетняк Д.В., Давыдова Н.В., Ефимушкина О.А., Путков С.Б. Анализ и сравнительная оценка эффективности гуморального иммунного ответа после вакцинации «Спутник V» с использованием различных наборов реагентов // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 469–480. doi: 10.15789/2220-7619-VRK-1977

Citation:
Kazakov S.P., Reshetnyak D.V., Davydova N.V., Efimushkina O.A., Putkov S.B. Various reagent kits for comparatively analyzed effectiveness of humoral immune response after vaccination "Sputnik V" // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 469–480. doi: 10.15789/2220-7619-VRK-1977

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-VRK-1977

лее 150 BAU/мл наблюдался у 59,3–90,5% испытуемых, уровень выше 500 BAU/мл — у 22,0–52,4%, в зависимости от используемого метода и набора реагентов. Исходя из полученных данных, сделан вывод о том, что все использованные наборы реагентов, включая полуколичественные тесты отечественного производства, могут быть признаны адекватными для оценки эффективности ПИО в отношении выработки специфических антител.

Ключевые слова: *новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, вакцина, «СпутникV», поствакцинальный иммунитет, мониторинг, уровень антител, антитела к РСД S-белка, антитела к полноформатному тримеризованному S-белку.*

VARIOUS REAGENT KITS FOR COMPARATIVELY ANALYZED EFFECTIVENESS OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE AFTER VACCINATION "SPUTNIK V"

Kazakov S.P.[a,c], Reshetnyak D.V.[a], Davydova N.V.[a], Efimushkina O.A.[b], Putkov S.B.[a]

[a] *Main Military Clinical Hospital named after academician N.N. Burdenko Russian Defense Ministry, Moscow, Russian Federation*
[b] *Diagnostic Clinical Center No. 1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation*
[c] *Russian Medical Academy for Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation*

Abstract. Modern methods of vaccination have confirmed their high effectiveness in fighting against the pandemic of a novel coronavirus infection. However, the use of various types of vaccines requires studying the effectiveness of the post-vaccination immune response (PIO), first of all, assessing the specificity and amount of production of antibodies to the surface and internal antigens of the SARS-CoV-2 virus, in particular, after the use of the most promising domestic vaccine "Gam-Covid-Vac" ("Sputnik V"). In particular, the data on the effectiveness of PVIR (increased antibody level) for the most promising domestic vaccine "Gam-Covid-Vac" ("Sputnik V") need to be confirmed. It is also necessary to evaluate the effectiveness of the laboratory methods used for this purpose. To assess the effectiveness of PVIR, samples of biomaterial (blood serum) obtained on the 22–25 day after inoculation of the second component of the vaccine from 202 "Sputnik V"-vaccinated, not preimmunized subjects, lacking antibodies to SARS-CoV-2 before vaccination, were examined. The levels of IgG and IgM antibodies to the surface and nucleocapsid antigens of the SARS-CoV-2 virus were determined using several semi-quantitative and quantitative methods and reagent kits from national and foreign manufacturers. To assess the diagnostic effectiveness of the methods, a comparative analysis of the specificity and sensitivity of all the laboratory methods used and a data correlation for various quantitative methods (using the Spearman correlation coefficient) between antibodies specific to the full-sized trimerized S-protein and the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 S-protein were carried out. During the study, it was determined that all the reagent kits used to study IgG antibodies against SARS-CoV-2 S-protein and S-protein RBD showed maximum (100%) specificity in in the majority subjects (from 186 to 202 samples). The relevance of the data (comparative specificity), both for semi-quantitative and quantitative ELISA as well as for both ILA test systems regarding qualitative characteristics ("positive"–"negative") was also close to the maximum magnitude (98.4–99.4%). A post-vaccination immune response during Sputnik V vaccination analyzing production of specific IgG antibodies was observed in 98.9% of all vaccinated subjects. IgG antibody range was studied to assess related "protective" level. Data are presented that a "protective" level of more than 150 BAU/мл was observed in 59.3–90.5% of the subjects, above 500 BAU/мл — in 22.0–52.4% of the subjects, depending on the method used and the set of reagents. Based on the data obtained, it is concluded that all the methods and kits of reagents used, including domestically manufactured semi-quantitative tests, can be considered adequate to assess effectiveness of the post-vaccination immune response analyzing production of SARS-CoV-2-specific antibodies.

Key words: *COVID-19, SARS-CoV-2, vaccine, Sputnik V, post-vaccination immunity, monitoring, level antibodies. antibodies to RBD S-protein, antibodies to full-format trimerized S-protein.*

Введение

Достигнутые успехи в разработке новых методов профилактики, диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции (НКИ), вызванной вирусом SARS-CoV-2, позволяют говорить о наличии в стране эффективных комплексных способов терапии [1, 2, 3], которые продолжают совершенствоваться по настоящее время. Методы вакцинопрофилактики НКИ также подтвердили свою высокую эффективность в борьбе с пандемией [4]. С учетом быстрого использования вакцин, наличия разных типов вакцин, появления в мире технологий по определению стандартизированных антител как отечественных, так и зарубежных производителей, в количественном измерении, возникают вопросы, связанные с оценкой эффективности вакцинации в зависимости от ее типа. Использование в нашей стране не только векторных, но и инактивированных, и белковых вакцин требует изучения вопроса об эффективности поствакцинального иммунного ответа (ПИО), характеризующегося прежде всего выработкой специфических антител к различным антигенам вируса. Исходя из этого применялись наборы реагентов для детекции различных антител (в том числе количественным методом) к полноформатному S-белку, рецептор-связывающему домену S-белка (RBD-S), N-белку [5].

В настоящее время одним из основных и доступных способов является оценка гумораль-

ного иммунитета по уровню продукции специфических антител класса IgG к поверхностному спайк-белку (S-protein), к его рецептор-связывающему домену (RBD) вируса SARS-CoV-2, а также к нуклеокапсидному белку (N-белку) SARS-CoV-2, если это касается вакцин на основе инактивированных вирусов [5, 6, 7, 12]. Наиболее актуальной для лабораторной диагностики остается проблема выбора метода исследования для объективизации и известной стандартизации оценки эффективности ПИО [5, 6, 7, 8, 9]. Продолжается активная дискуссия [9, 10, 11, 12] относительно определения целевого уровня так называемых «защитных» антител, достигаемого вакцинацией и обеспечивающего эффективный ПИО.

В клинических условиях для такой оценки применяются самые различные лабораторные методы, использующие отечественные и зарубежные наборы реагентов, в связи с чем необходимым является проведение сравнительных исследований, в частности, антител к S-белку и RBD S-белка для разных диагностических систем. Особенно это важно для количественных тест-систем, способных определять абсолютный количественный уровень специфических антител и позволяющих напрямую оценивать диагностическую эффективность гуморальной составляющей ПИО.

Нами была проведена работа по оценке уровней антител в отношении инактивированной вакцины «КовиВак», в результате которой получены новые научные данные об эффективности использования этой вакцины по выявлению разного спектра антител и их уровней [12].

Закономерно возникает вопрос об оценке ПИО после применения «Гам-Ковид-Вак» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России («Спутник V»). По данным ряда авторов [13, 14], вакцина «Спутник V» доказала свою эффективность, в то же время детальная оценка количественных уровней антител до сегодняшнего дня не проводилась.

Целью работы явилось проведение сравнительной оценки эффективности гуморального ПИО, основанного на выработке различных уровней специфических антител к S-белку SARS-CoV-2 у вакцинированных «Спутник V» с использованием различных наборов реагентов.

Материалы и методы

В изучаемую группу было включено 202 испытуемых (табл. 1), вакцинированных «Спутник V». Все испытуемые были ранее не иммунизированными (не имели клинических проявлений НКИ и ранее не вакцинировались), что подтверждено отсутствием антител к SARS-CoV-2 при исследованиях, проводившихся у этих лиц иммуноферментным методом (ИФА) за 3–11 дней до начала вакцинации. Образцы биоматериала (сыворотки крови) были получены на 22–25 сутки после введения второго компонента данной вакцины в период с ноября 2020 г. по июль 2021 г.

У испытуемых определялись суммарные антитела класса IgM к антигенам рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного S-белка и нуклеокапсиду (N-белок) SARS-CoV-2 полуколичественным ИФА с использованием набора реагентов (НР) «SARS-CoV-2 IgM ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Антитела IgG к полноразмерному тримеризованному S-белку SARS-CoV-2 определялись с использованием полуколичественного ИФА на НР «SARS-CoV-2 IgG ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Результаты, полученные на этих двух НР, измерялись в условных единицах (У.Е.) с использованием «коэффициента позитивности». Также антитела IgG к S-белку исследовались количественным ИФА на НР «SARS-CoV-2-IgG-Количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Результат рассчитывался в «Binding Antibody Units» (BAU/мл).

Антитела IgG к RBD S-белка определялись количественным иммунохемилюминесцентным методом (ИХЛА) с использованием НР: «SARS-CoV-2 IgGII» — на анализаторе «Architect i1000SR» (Abbott, США) и «SARS-CoV-2 IgG (CLIA)» — на анализаторе серии «CL-2000» (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., КНР). Результаты для данных НР были представлены в BAU/мл.

Также в табл. 1 представлены ранее полученные данные исследования в ноябре-декабре 2020 г. у 50 пациентов на 21–25 сутки после вакцинации «Спутник V» на наличие антител IgG к N-белку SARS-CoV-2. Эти данные были получены с использованием тест-системы полуколичественного ИХЛА «SARS-CoV-2 IgG» на анализаторе «Architect i4000SR» (Abbott, США).

Для определения специфичности всех применяемых НР были использованы образцы биоматериала (сыворотки крови) от 210 неиммунизированных испытуемых, не имевших антител классов IgG и IgM к SARS-CoV-2.

Полученные результаты исследования обрабатывались с помощью базы данных «Excel» и статистической программы «IBM SPSS Statistics». Дополнительно для получения статистических данных использовали корреляционный анализ по Спирмену — коэффициент корреляции по Спирмену (ККС).

Принимая во внимание данные ряда авторов [15, 16, 17, 18, 19, 20], высказывавших предположение о том, что минимальный эффективный («защитный») уровень антител к S-белку или RBD S-белка должен составлять не менее

Таблица 1. Характеристика использованных НР

Table 1. Characteristics of the reagent sets used

Тест-системы Name of the test system / **Характеристики** Specifications	**«SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» D-5501** «SARS-CoV-2-IgG-enzyme immuneassay-Best» D-5501	**«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» D-5502** «SARS-CoV-2-IgG-enzyme immuneassay-Best» D-5502	**«SARS-CoV-2-IgG количественный ИФА-БЕСТ» D-5505** «SARS-CoV-2-IgG quantitative enzyme immuneassay-Best» D-5505	**«Abbott» «SARS-CoV-2 IgG»***	**«Abbott» «SARS-CoV-2 IgG II»**	**«Mindray» «SARS-CoV-2 IgG (CLIA)»**
Тип исследования Type of study	**Полуколичественный ИФА** Semi-quantitative Best D-5501 ELISA	**Полуколичественный ИФА** Semi-quantitative Best D-5502 ELISA	**Количественный ИФА** Quantitative Best D-5505 ELISA	**Полуколичественный ИХЛА** Semi-quantitative immunochemi-luminescence analysis	**Количественный ИХЛА** Quantitative immunochemi-luminescence analysis	**Количественный ИХЛА** Quantitative immunochemi-luminescence analysis
Исследуемый антиген The studied antigen	S	S, RBD S, N	S	N	RBD S	RBD S
Единицы измерения Units of of measurement	**У.Е.** Conventional units (CU)	**У.Е.** CU	**BAU/мл** BAU/ml	**У.Е.** CU	AU/ml (= 0,14 BAU/ml)	U/ml (= 1,15 BAU/ml)
Предел измерений Measurement limit	18,1	18,1	1000	40	47 000	25 000
Предел референсных значений Limit of reference values	< 1,1	< 1,1	< 10	< 1,4	< 50 (< 7,1 BAU)	< 10 (< 8,6 BAU)
Количество обследованных неиммунизированных пациентов (n) Number of non-immunized patients examined (n)	205	205	205	–	186	192
Количество «отрицательных результатов» Number of «negative» results	205	205	205	–	186	192
Специфичность НР (%) Specificity of the reagent set (%)	100	100	100	–	100	100
Количество обследованных вакцинированных «Спутник V» (n) The number of examined "Sputnik V" vaccinated patients (n)	202	202	63	50	181	181

Примечание. *Данные Мудрова В.П. и Решетняка Д.В. (2020).

Note. The data obtained by Mudrov V.P. and Reshetnyak D.V. (2020).

150 BAU/мл (в диапазоне 150–550 BAU/мл), условным критерием наличия антител мы установили выявление уровня антител класса IgG ≥ 1,1 У.Е. в ИФА и ≥ 7,1 BAU/мл в ИХЛА, промежуточным (однозначно сопровождавшимся выработкой значимого количества антител) ≥ 150 BAU/мл и надежным (достигаемым целевым значением) ≥ 500 BAU/мл (≥ 3872 BAU/мл) в количественных исследованиях.

Результаты

Оценка специфичности используемых НР отражена в табл. 1.

Как следует из полученных данных, все использованные НР при определении антител класса IgG к S-белку и к RBD S-белка SARS-CoV-2 у испытуемых без признаков НКИ и невакцинированных, показали отличные результаты на достаточном количестве испытуемых (186–205 человек) с максимальной специфичностью, составившей во всех случаях 100% при тестировании 186 и более образцов.

Общие данные, полученные с использованием различных тест-систем, приведены в табл. 2.

Полученные ранее (Мудров В.П., Решетняк Д.В., 2020) результаты исследования полуколичественным ИФА наличия антител к N-белку SARS-CoV-2 у ранее неиммунизированных вакцинированных «Спутник V» закономерно указывают на отсутствие таких антител в ответ на вакцинацию векторной вакциной [5, 6]: у 50 обследованных они в количестве, превышающем референсные значения (РЗ) (РЗ, ≥ 1,4 У.Е.), не обнаруживались и лишь у двоих (4%) находились в «серой зоне» (1,2–1,4 У.Е.), вероятнее всего, вследствие предшествующего контакта с вирусом, без клинических проявлений НКИ.

Полуколичественным ИФА антитела IgG с уровнем выше РЗ (≥ 1,1 У.Е.) обнаружены у 201 из 202 (99,5%) испытуемых, в том числе ≥ 10,0 У.Е. у 163 (80,7%) и ≥ 15,0 У.Е. у 136 (67,3%). В среднем у «положительных» уровень антител составил 14,5 У.Е.

В исследованиях полуколичественным ИФА совокупный уровень антител класса IgM выше РЗ (≥ 1,1 У.Е.) выявлен у 50 (24,8%) испытуемых, разброс 1,1–16,0 У.Е., в среднем у «положительных» — 4,1 У.Е., в том числе у 6 — от 10 до 15 У.Е. и у одного — > 15 У.Е. У всех испытуемых с «положительным» результатом на антитела IgM уровень антител IgG также был выше РЗ и составлял в среднем 15,2 У.Е., у «отрицательных» по IgM — 14,2 У.Е.

Количественным ИФА у всех 63 (100%) испытуемых антитела IgG выявлены в количестве, превышающем РЗ, разброс значений 24,4–672,6 BAU/мл, в среднем — 454,1 BAU/мл. У 57 (90,5%) уровень антител был ≥ 150 BAU/мл, в среднем 494,4 BAU/мл, у 33 (52,4%) в среднем — ≥ 500 BAU/мл.

В группе обследованных количественными НР для ИФА в сравнении с данными полуколичественного ИФА, уровень антител для полуколичественного анализа в среднем составил 14,3 У.Е. при одном «отрицательном» результате. У испытуемых с уровнем антител в количественном ИФА ≥ 150 BAU/мл среднее значение составило 14,9 У.Е. и ≥ 500 BAU/мл — 15,8 У.Е.

Таким образом, в целом оба НР продемонстрировали высокую сходимость результатов по превышению РЗ: для всей группы — 98,4%, для группы ≥ 150 BAU/мл и ≥ 500 BAU/мл — 100% (табл. 3).

Количественное исследование уровня антител к RBD S-белка методом ИХЛА с НР «Abbott» дало следующие результаты: уровень антител у 182 испытуемых составил 3,4–5591,6 BAU/мл, в среднем — 459,6 BAU/мл. Уровень выше РЗ (≥ 7,1 BAU/мл) отмечен у 181 (99,5%), ≥ 150 BAU/мл — у 108 (59,3%) и ≥ 500 BAU/мл — у 40 (22,0%) испытуемых.

В группе обследованных на НР методом ИХЛА «Abbott» и полуколичественным ИФА уровень антител в ИФА в среднем составил 14,4 У.Е. при двух «отрицательных» результатах. При уровне антител в ИХЛА ≥ 150 < 550 BAU/мл и ≥ 550 BAU/мл среднее значение в ИФА соответствовало 17,0 У.Е.

Таким образом, в целом оба метода продемонстрировали высокую сходимость результатов по превышению РЗ: для всей группы — 98,9%, для группы ≥ 150 BAU/мл и ≥ 500 BAU/мл — 100% (табл. 4).

В сравнении НР количественного ИФА (n = 63) антител IgG к S-белку и ИХЛА IgG к RBD S-белка для всех испытуемых соответствие по результатам выше РЗ составило 98,4% при одном «отрицательном» в ИХЛА. Для всех рассмотренных диапазонов результатов ИХЛА ≥ 7,1 BAU/мл уровень антител был максимально сопоставимым (100%). В среднем количественный ИФА давал более высокие значения антител к S-белку (465,3 BAU/мл), чем ИХЛА для антител к RBD (318,6 BAU/мл). «Точное» соответствие результатов по уровням антител к RBD S-белка в ИХЛА и полноформатному S-белку в количественном ИФА было невысоким при количестве антител в ИХЛА < 150 BAU/мл (12,0%) и ≥ 150 < 550 BAU/мл (22,7%), однако достигало 80,0 и 94,6% при уровнях ≥ 550 и ≥ 150 соответственно. При этом корреляция между уровнями двух видов антител для всех диапазонов результатов была статистически достоверной с высоким ККС в 0,73–0,82 (табл. 5).

В количественном исследовании методом ИХЛА уровня антител IgG к RBD S-белка НР

Таблица 2. Выявление антител к SARS-CoV-2 различными НР

Table 2. SARS-CoV-2-specific antibodies detected by different sets of reagents

Тест-системы Name of the test system / **Результаты** Results	**«SARS-CoV-2-IgG-ИФА-Бест» D-5501** «SARS-CoV-2-IgG-enzyme immunoassay-Best» D-5501		**«SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест» D-5502** «SARS-CoV-2-IgG-enzyme immunoassay-Best» D-5502		**«SARS-CoV-2-IgG количественный ИФА-Бест» D-5505** «SARS-CoV-2-IgG quantitative enzyme immunoassay-Best» D-5505		**«Abbott» «SARS-CoV-2 IgG»**		**«Abbott» «SARS-CoV-2-IgG II»**		**«Mindray» «SARS-CoV-2-IgG (CLIA)»**	
	Все Total	**%**	**Все** Total	**%**	**Все** Total	**%**	**Все** Total	**%**	**Все** Total	**%**	**Все** Total	**%**
≥ 550 BAU/мл (≥ 15 У.Е.) ≥ 550 BAU/ml (≥ 15 CU)	136	67,3	–	–	33	52,4	–	–	40	22,0	54	30,3
≥ 150 BAU/мл (≥ 10 У.Е.) ≥ 550 BAU/ml (≥ 15 CU)	163	80,7	–	–	57	90,5	–	–	108	59,3	115	64,6
«Положительные» Positive results	200	99,0	50	24,8	63	100	0	0	181	99,5	177	98,9
Всего биопроб Total samples	202	100	202	100	63	100	50	100	182	100	179	100

Таблица 3. Сравнительные результаты по уровням антител IgG к полноформатному S-белку с использованием полуколичественного и количественного ИФА

Table 3. Comparative results on level of IgG antibodies specific to full-sized S-protein using semi-quantitative and quantitative enzyme immunoassay

Уровни антител у испытуемых (количественный ИФА, BAU/мл) Antibody levels in the tested patients (quantitative enzyme immunoassay, BAU/ml)		**Вакцинированные «Спутник V», ранее неиммунизированные (n = 63)** Patients vaccinated with "Sputnik V", not preimmunized (n = 63)						
		Количество испытуемых с соответствующим уровнем антител IgG к S-белку (количественный ИФА, BAU/мл, РЗ < 7,1)** The number of test patients with the appropriate level of IgG antibodies to the S-protein (quantitative enzyme immunoassay, BAU/ml, RV < 7.1)			**Количество испытуемых (полуколичественный ИФА, У.Е., РЗ < 1,1) соответственно группе количественного ИФА** The number of tested patients (semi-quantitative enzyme immunoassay, the coefficient of positivity, RV < 1.1) according to quantitative enzyme immunoassay			**Соответствие, %** Correspondence, %
		Все/Total	**%**	**Среднее**/Average	**Все** (Total) ≥ **1,1**	**Разброс**/Range	**Среднее**/Average	
≥ 7,1 < 150		6	9,5	71,5	5	0–14,0	7,6	83,3
«Защитные» «Protective»	**≥ 150 < 550**	24	38,0	365,5	24	5,6–17,7	13,6	100
	≥ 550	33	52,4	588,2	33	5,2–18,1*	15,8	100
	Всего (Total) ≥ **150**	57	90,5	494,4	57	5,6–18,1*	14,9	100
Все (Total) ≥ **7,1**		63	100	454,1	62	0–18,1*	14,3	98,4

Примечание. *Предел корректного измерения для данного метода. **Референсные значения.

Note. *The limit of correct modification for this method. **Reference value.

компании «Mindray» уровень антител у 178 испытуемых составил 5,3–6892,5 BAU/мл, в среднем — 552,4 BAU/мл. Уровень выше РЗ (≥ 8,6 BAU/мл) отмечен у 176 (98,9%), ≥ 150 BAU/мл — у 115 (64,6%) и ≥ 500 BAU/мл — у 54 (30,3%) испытуемых.

В группе обследованных как методом ИХЛА «Mindray», так и полуколичественным ИФА уровень антител в ИФА в среднем составил 14,4 У.Е. при двух «отрицательных» результатах, у испытуемых с уровнем антител в ИХЛА ≥ 150 < 500 BAU/мл и ≥ 550 BAU/мл — 16,9 У.Е. и 17,0 У.Е. соответственно. Таким образом, в целом оба метода также продемонстрировали высокую сходимость результатов по превышению РЗ: для всей группы — 99,4%, для группы ≥ 150 < 550 BAU/мл и ≥ 550 BAU/мл — 100% (табл. 6).

В сравнении с исследованием количественным ИФА (n = 62) антител к S-белку для всех обследованных двумя методами соответствие по результатам выше РЗ составило 98,4% при одном «отрицательном» в ИХЛА. Для всех рассмотренных диапазонов результатов ИХЛА ≥ 8,6 BAU/мл уровень антител так же был максимально сопоставимым (100%). В среднем результаты количественного ИФА и ИХЛА «Mindray» были очень близкими по значению: уровень антител к S-белку (458,2 BAU/мл) в сравнении с уровнем антител к RBD (470,9 BAU/мл). «Точное» соответствие результатов по уровням антител к RBD S-белка в ИХЛА и полноформатному S-белку в количественном ИФА было невысоким при количестве антител в ИХЛА < 150 BAU/мл (13,6%), средним в диапазоне ≥ 150 < 550 BAU/мл (63,2%), и достигало высоких значений 85,0 и 94,9% при уровнях ≥ 550 и ≥ 150 < 500 BAU/мл соответственно. При этом корреляция между уровнями двух видов антител, определяемых разными НР методами ИХЛА и ИФА, для всех диапазонов результатов была статистически достоверной, со средним уровнем ККС (0,56–0,81): наименьшим — для значений ≥ 150 BAU/мл (0,56) и высоким — для всей группы (0,81), что связано со спецификой «компактного» распределения результатов в ИФА (табл. 7).

При сравнении результатов, полученных в количественном ИХЛА на тест-системах «Abbott» и «Mindray», значения для уровней антител к RBD S-белка в двух группах были схожими: в среднем — 439,6 BAU/мл (с разбросом 3,5–5591,6) и 552,4 BAU/мл (5,3–6892,5) соответственно, и статистически достоверно не различались в группе с уровнем антител ≥ 550 BAU/мл.

Соответствие результатов по всей группе и в отношении результатов выше РЗ (≥ 7,1 и ≥ 8,6 BAU/мл соответственно) составило 99,4%, с ККС — 0,9. Достаточно высокое «точное» соответствие в 70,8 и 82,4% получено для уровня ан-

Таблица 4. Сравнительные результаты по уровням антител IgG к S-белку и к RBD S-белка с использованием полуколичественного ИФА и ИХЛА (НР «Abbott»)

Table 4. Comparatively analyzed level of IgG antibodies specific to SARS-CoV-2 S-protein and S-protein RBD using semi-quantitative enzyme immunoassay and immunochemiluminescence assays ("Abbott" reagent kit)

Уровни антителу испытуемых (ИХЛА, НР «Abbott», BAU/мл) Antibody levels in test patients (immunochemiluminescence analysis with a set of reagents "Abbott", BAU/ml)		**Вакцинированные «Спутник V», ранее неиммунизированные (n = 182)**/Patients vaccinated with "Sputnik V", not preimmunized (n = 182)			**Количество испытуемых (полуколичественный ИФА, У.Е., РЗ < 1,1) соответственно группе ИХЛА** The number of tested patients (semi-quantitative enzyme immunoassay, the coefficient of positivity, RV < 1.1) corresponds to the group of immunochemiluminescence analysis			**Соответствие, %** Correspondence, %
		Все/Total	%	**Среднее**/Average	**Все** (Total) ≥ 1,1	**Разброс**/Range	**Среднее**/Average	
≥ 7,1 < 150		73	40,1	68,7	72	1,1–17,8	10,6	98,6
«Защитные» «Protective»	≥ 150 < 550	68	37,3	728,0	68	9,2–18,1*	17,0	100
	≥ 550	40	22,0	1517,5	40	9,2–17,9	17,0	100
	Всего (Total) ≥ 150	108	59,3	728,0	108	9,2–18,1*	17,0	100
Все (Total) ≥ 7,1		181	99,5	462,1	180	1,1–18,1*	14,4	99,4
Итого (Subtotal)		182	100	459,6 (3,4–5591,6)	180	0–18,1*	14,4	98,9

Примечание. *Предел корректного измерения для данного метода.

Note. *The limit of correct measurement for the method.

Таблица 5. Сравнительные результаты по уровням антител IgG к RBD S-белка и к S-белку с использованием количественного ИФА и ИХЛА (НР реагентов «Abbott»)

Table 5. Comparatively analyzed level of IgG antibodies specific to SARS-CoV-2 S-protein RBD and S-protein using quantitative enzyme immunoassay and immunochemiluminescence assays ("Abbott" reagent kit)

Уровни антител у испытуемых (ИХЛА, набор реагентов «Abbott», BAU/мл) Antibody levels in the test patients (immunochemiluminescence analysis with a set of reagents "Abbott", BAU/ml)		**Вакцинированные «Спутник V», ранее неиммунизированные (n = 63)**/Patients vaccinated with "Sputnik V", not preimmunized (n = 63)							
		Количество испытуемых с соответствующим уровнем антител IgG к RBD S-белка (ИХЛА, BAU/мл, РЗ < 7,1) The number of test patients with the appropriate level of IgG antibodies to S-protein RBD (immunochemiluminescence analysis, BAU/ml, RV < 7.1)			**Количество испытуемых (количественный ИФА, BAU/мл, РЗ < 10,0) соответственно группе ИХЛА** The number of tested patients (quantitative enzyme immunoassay, BAU/ml, RV < 10.0) according to immunochemiluminescence analysis			**Соответствие, %** Correspondence, %	**ККС**** SCC**
		Все/Total	%	**Среднее**/Average	**Все*** (Total*) ≥ 10,0	**Разброс**/Range	**Среднее**/Average	**Все** (Total) ≥ 10,0	
≥ 7,1 < 150		25	39,7	71,2	3 (25)	49,0–628,3	357,8	12,0 (100)	0,76
«Защитные» "Protective"	**≥ 150 < 550**	22	34,9	275,7	5 (22)	67,5–626,3	524,3	22,7 (100)	0,73
	≥ 550	15	23,8	827,7	12 (15)	104,7–672,6	564,5	80,0 (100)	0,78
	Всего (Total) **≥ 150**	37	58,7	490,4	35 (37)	67,5–672,6	540,0	94,6 (100)	0,82
Все (Total) **≥ 7,1**		62	98,4	318,6	62	49,0–672,6	465,3	100	0,78
Все (Total) **< 7,1**		1	1,6	–	0	–	24,4	0	–
Итого (Subtotal)		63	100	303,2 (3,4–1754,5)	63	24,4–672,6	458,2	100 (98,4)	0,79

Примечание. *Точное соответствие для выбранного диапазона результатов ИХЛА. **Коэффициент корреляции (по Спирмену).

Note. *Exact correspondence for select range of immunochemiluminescence analysis results. **Spearman Correlation Coefficient.

Таблица 6. Сравнительные результаты уровней антител IgG к RBD S-белка и к S-белку с использованием количественного ИФА и ИХЛА (НР «Mindray»)

Table 6. Comparatively analyzed level of IgG antibodies specific to SARS-CoV-2 S-protein RBD and S-protein using semi-quantitative enzyme immunoassay and immunochemiluminescence assays ("Mindray" reagent kit)

Уровни антител у испытуемых (ИХЛА, набор реагентов «Mindray», BAU/мл) Antibody levels in test patients (immunochemiluminescence analysis with a set of reagents "Mindray", BAU/ml)		**Вакцинированные «Спутник V», ранее неиммунизированные (n = 178)**/Patients vaccinated with "Sputnik V", not preimmunized (n = 178)						
		Количество испытуемых с соответствующим уровнем антител IgG к RBD S-белка (ИХЛА, BAU/мл, РЗ < 8,6) The number of test patients with the appropriate level of IgG antibodies to RBD S-protein (immunochemiluminescence analysis, BAU/ml, RV < 8.6)			**Количество испытуемых (полуколичественный ИФА, коэффициент позитивности, РЗ < 1,1) соответственно группе ИХЛА** The number of test patients (semi-quantitative enzyme immunoassay, the coefficient of positivity, RV < 1.1) according to immunochemiluminescence analysis			**Соответствие, %** Correspondence, %
		Все/Total	%	**Среднее**/Average	**Все** (Total) **≥ 1,1**	**Разброс**/Range	**Среднее**/Average	
≥ 8,6 < 150		61	34,3	79,4	60	1,1–17,8	9,8	98,4
«Защитные» "Protective"	**≥ 150 < 550**	61	34,3	310,2	61	6,0–18,1*	16,8	100
	≥ 550	54	30,3	1412,3	54	10,4–18,1*	17,0	100
	Всего (Total) **≥ 150**	115	64,6	817,4	115	6,0–18,1	16,9	100
Все (Total) **≥ 8,6**		176	98,9	558,6	175	1,1–18,1*	14,4	99,4
Все (Total) **< 8,6**		2	1,1	6,1	1	0–6,1	–	50,0
Итого (Subtotal)		178	100	552,4	178	0–18,1*	14,4	99,4

Примечание. *Предел корректного измерения для данного метода.

Note. *The limit of correct measurement for the method.

тител ≥ 150 < 550 BAU/мл и для низкого уровня антител < 150 BAU/мл, не являющимся защитным, ККС составил 0,77 и 0,90 соответственно. Отмечено, что наибольшее соответствие в 94,7% получено для уровней антител ≥ 550 BAU/мл с наиболее высоким ККС в 0,94 (табл. 8).

Обсуждение

Приведенные выше данные позволяют сделать вывод о том, что все использованные нами НР для определения антител класса IgG к поверхностным антигенам SARS-CoV-2 полноформатного тримеризованного S-белка и RBD S-белка показали высокую специфичность и чувствительность, позволив выявить у ранее ранее не иммунизированных вакцинированных «Спутник V» наличие антител в 98,9–100% случаев (табл. 2). Соответствие результатов как для полуколичественного и количественного ИФА, так и для двух ИХЛА тест-систем, по качественной характеристике («положительно»—«отрицательно») также было близко к максимальным значениям (98,4–99,4%). Вместе с тем качество и спектр выявляемых антител был различным, что требует детального изучения особенностей ПИО.

Предполагаемый «защитный» уровень антител ≥ 150 BAU/мл наблюдался в зависимости от вида антител и НР в 59,3% («Abbott») — 90,5% (ИФА количественный) случаев, ≥ 550 BAU/мл — в 22,0% («Abbott») и в 52,4% (ИФА количественный). НР «Mindray» в результате сравнения занимали промежуточное положение: 64,6 и 30,3% соответственно.

Мы позволим себе высказать предположение, что НР для полуколичественного ИФА могут быть условно пригодны и для «примерного» определения количества антител, хотя утверждать это статистически точно не представляется возможным из-за наличия в таких тестах жесткого предела (18,1 У.Е.) для корректного измерения. Однако можно предполагать, что «защитный» уровень антител в группах ≥ 150 BAU/мл и ≥ 550 BAU/мл, выявляемый количественными методами, может условно соответствовать значениям ≥ 10 У.Е. и ≥ 15 У.Е., наблюдавшимся у 80,7 и 67,3% вакцинированных (табл. 2). Соответствие результатов всех трех количественных НР в диапазоне значений ≥ 150 BAU/мл было высоким и составляло 94,9–100%. Несколько меньшим (80,0–94,7%) было точное соответствие для значений ≥ 500 BAU/мл и сравнительно низким (12,0–82,5%) — для значений < 150 BAU/мл, что связано прежде всего с тем, что методом количественного ИФА определялись антитела к полноформатному S-белку, а ИХЛА — к RBD S-белка. Несмотря на такие расхождения, между результатами всех методов имелась статистически достоверная корреляция (ККС 0,56–0,9).

Таблица 7. Сравнительные результаты уровней антител IgG к RBD S-белка и к S-белку с использованием ИХЛА (НР «Mindray») и количественного ИФА
Table 7. Comparatively analyzed IgG antibodies specific to SARS-CoV-2 S-protein RBD and S-protein using immunochemiluminescence analysis ("Mindray" reagent kit) and quantitative enzyme immunoassay

Уровни антител у испытуемых (ИХЛА, BAU/мл) Antibody levels in test patients (immunochemiluminescence analysis, BAU/ml)		**Вакцинированные «Спутник V», ранее неиммунизированные (n = 62)**/Patients vaccinated with "Sputnik V", not preimmunized (n = 62)						
		Количество испытуемых с соответствующим уровнем антител IgG к RBD S-белка (ИХЛА, BAU/мл, P3 < 7,1) The number of test patients with the appropriate level of IgG antibodies to RBD S-protein (immunochemiluminescence analysis, BAU/ml, RV < 7.1)		**Количество испытуемых (количественный ИФА, BAU/мл, P3 < 10,0) соответственно группе ИХЛА** The number of test patients (quantitative enzyme immunoassay, BAU/ml, RV < 10.0) corresponding to the group of immunochemiluminescence analysis			**Соответствие, %** Correspondence, %	**ККС**** SCC**
		Все/Total	%	**Среднее**/Average	**Все*** (Total*) ≥ 10,0	**Разброс**/Range	**Среднее**/Average	**Все** (Total) ≥ 10,0	
≥ 8,6 < 150		22	35,5	89,6	3 (22)	49,0–599,3	352,6	13,6 (100)	0,67
«Защитные» "Protective"	**≥ 150 < 550**	19	30,6	299,8	12 (19)	67,5–626,3	481,3	63,2 (100)	0,59
	≥ 550	20	32,3	1076,1	17 (20)	104,7–672,6	574,1	85,0 (100)	0,63
	Всего (Total) **≥ 150**	39	62,9	697,9	37 (39)	67,5–672,6	528,8	94,9 (100)	0,56
Все (Total) **≥ 8,6**		61	98,4	478,5	61	49,0–672,6	465,3	100	0,81
Все (Total) **< 8,6**		1	1,6	–	0	–	24,4	0	–
Итого (Subtotal)		62	100	470,9 (5,3–3128,8)	62	24,4–672,6	458,2	100 (98,4)	0,81

Примечание. *Точное соответствие для выбранного диапазона результатов ИХЛА. **Коэффициент корреляции (по Спирмену).
Note. *An exact correspondence for select range of results of the immunochemiluminescence analysis. **Spearman Correlation Coefficient.

Таблица 8. Сравнительные результаты уровней антител IgG к RBD S-белка в количественном ИХЛА

Table 8. Comparatively analyzed level of IgG antibodies specific to SARS-CoV-2 S-protein RBD in quantitative immunochemiluminescence analysis

Уровни антител у испытуемых (ИХЛА «Abbott», BAU/мл) Antibody levels in the tested patients (immunochemiluminescence analysis with a set of reagents "Abbott", BAU/ml)		**Вакцинированные «Спутник V», ранее неиммунизированные (n = 172)**/Patients vaccinated with "Sputnik V", not preimmunized (n = 172)							
		Количество испытуемых с соответствующим уровнем антител IgG к RBD S-белка (ИХЛА «Abbott», BAU/мл, P3 < 7,1) The number of test patients with the appropriate level of IgG antibodies to RBD S-protein (immunochemiluminescence analysis "Abbott", BAU/ml, RV < 7.1)			**Количество испытуемых (ИХЛА «Mindray», BAU/мл, P3 < 8,6) соответственно группе «Abbott»** The number of tested patients (immunochemiluminescence analysis "Mindray", BAU/ml, RV < 8.6) according to the "Abbott" group			**Соответствие, %** Correspondence, %	**ККС**** SCC**
		Все/Total	%	**Среднее**/Average	**Все*** (Total*) ≥ **8,6**	**Разброс**/Range	**Среднее**/Average	**Все** (Total) ≥ **8,6**	
≥ **7,1 < 150**		68	40,1	68,7	56 (67)	14,1–407,9	94,8	82,4 (98,5)	0,9
«Защитные» «Protective»	≥ **150 < 550**	65	37,8	295,4	46 (65)	126,9–784,6	404,5	70,8 (100)	0,77
	≥ **550**	38	22,1	1480,2	36 (38)	125,3–6892,5	1633,8	94,7 (100)	0,94
	Всего (Total) ≥ **150**	103	59,9	732,5	103 (103)	125,3–6892,5	842,7	100 (100)	0,81
Все (Total) ≥ **7,1**		171	99,4	459,1	170	5,3–6892,5	558,6	99,4	0,9
Все (Total) < **7,1**		1	0,6	3,5	1	–	6,3	100	–
Итого (Subtotal)		172	100	439,6 (3,5–5591,6)	172	5,3–6892,5	552,4	100 (99,4)	0,9

Примечание. *Точное соответствие для выбранного диапазона результатов ИХЛА «Abbott». **Коэффициент корреляции (по Спирмену).

Note. *An exact correspondence for select range of results of the «Abbott» immunochemiluminescence analysis. **Spearman Correlation Coefficient.

Сравнив результаты данного исследования с параллельно проводившимся нами достаточно большим (n = 103) исследованием ПИО у вакцинированных «КовиВак» [12], можно с уверенностью сказать, что в отношении антител-продуцирующей составляющей ПИО «Спутник V» заметно (на 15,7–21,4%) превосходит показатели «КовиВак» (по уровню антител ≥ 7,1 BAU/мл — 98,9–100% к 78,6–81,6% соответственно, и по уровню ≥ 150 BAU/мл — 59,3–90,5% к 18,2–51,6% соответственно). С учетом того, что к моменту изучения влияния вакцины «КовиВак» общий уровень гибридной иммунизированности (совмещающей естественную и искусственную) испытуемых к НКИ заметно увеличился, преимущество «Спутник V» представляется еще более выраженным.

Выводы

На основании вышеприведенных данных можно сделать вывод о том, что вакцинация «Спутник V» дает значительный прирост уровней антител класса IgG к полноформатному S-белку и RBD S-белка SARS-CoV-2 с гарантированным достижением «целевых» значений «защитных» антител (≥ 150 BAU/мл) более чем у половины вакцинируемых, тем самым позволяя предполагать выраженный и эффективный ПИО.

Полученные результаты свидетельствуют о приемлемости всех применявшихся нами НР и их соответствии своему предназначению, включая и полуколичественные методы. Исследуемые НР показали максимально высокие результаты специфичности (100%) при исследовании большого количества образцов.

Представляется, что полуколичественные НР отечественного производства по-прежнему применимы, как для скрининга НКИ, так и, пусть и ограниченно, для определения эффективности ПИО, что актуально в условиях имеющихся проблем с приобретением продукции ряда зарубежных производителей и возможностей импортозамещения.

Отечественные НР для количественного определения полноформатного S-белка SARS-CoV-2 способны занять достойное место среди диагностических средств в анализе эффективности ПИО. Несомненна перспектива применения доступных НР для ИХЛА из «дружественной» страны, позволяющих проводить тестирование больших объемов биоматериала с достаточно высоким качеством.

Также мы отмечаем очевидную необходимость подобного сравнительного тестирования всех рекомендуемых НР, особенно вносимых в списки подзаконных актов, направленных на борьбу с сохраняющейся опасностью пандемии НКИ.

Список литературы/References

1. 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.)*]
2. Извеков А.А., Капто О.В., Хритинин Д.Ф., Тян В.Н., Казаков С.П., Каракозов А.Г., Еремин М.Н., Сластников В.Ю., Молодова А.И., Ханыкин В.С. Применение рефлексотерапевтических методик в лечении транзиторных поствакцинальных реакций после иммунизации от COVID-19 // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. 2021. № 7. С. 504–510. [Izvekov A.A., Kapto O.V., Khritinin D.F., Tyan V.N., Kazakov S.P., Karakozov A.G., Eremin M.N., Slastnikov V.Yu., Molodova A.I., Khanykin V.S. The use of reflexotherapy techniques in the treatment of transient post-vaccination reactions after immunization against COVID-19. *Vestnik nevrologii, psikhiatrii i neyrokhirurgii = Bulletin of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery (Russia), 2021, no. 7, pp. 504–510. (In Russ.)*] *doi: 10.33920/med-01-2107-02*
3. Инструкция для тест-системы компании «Abbott» (декабрь 2020 г.): SARS-CoV-2 IgG II-количественные реагенты для «Architect» (SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit). [Instructions for the «Abbot» test system: SARS-CoV-2 IgG II-quantitative reagents for «Architect»]
4. Казаков С.П. Вакцины против новой коронавирусной инфекции: механизмы действия, возможности их применения у онкогематологических пациентов (Глава 1) // Ведение пациентов онкогематологического профиля в период пандемии COVID-19: руководство / Под ред. И.В. Поддубной. М.: Экон-Информ, 2022. С. 4–26. [Kazakov S.P. Vaccines against new coronavirus infection: mechanisms of action, possibilities of their use in oncohematological patients (Chapter 1). In: Management of oncohematological patients during the COVID-19 pandemic: guidelines. Ed. Poddubnaya I.V. *Moscow: Ekon-Inform, 2022, pp. 4–26. (In Russ.)*]
5. Казаков С.П., Сухоруков А.Л., Алимбарова Л.М., Чиркова Е.Ю., Путков С.Б. Диагностические возможности иммуноферментного анализа для определения специфических антител классов IgM, IgA, IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 // Госпитальная медицина: наука и практика. 2022. Т. 5, № 2. С. 61–68. [Kazakov S.P., Sukhorukov A.L., Alimbarova L.M., Chirkova E.Yu., Putkov S.B. Diagnostic capabilities of enzyme immunoassay for the determination of specific antibodies of Ig M., IgA, IgG classes to SARS-CoV-2 coronavirus. *Gospital'nayameditsina: nauka i praktika = Hospital Medicine: Science and Practice, 2022, vol. 5, no. 2, pp. 61–68. (In Russ.)*] *doi: 10.34852/GM3CVKG.2022.63.37.012*
6. Казаков С.П., Решетняк Д.В., Давыдова Н.В., Путков С.Б. Оценка эффективности гуморального иммунного ответа после вакцинации «КовиВаком» // Медицинский алфавит. 2022. № 6. С. 18–24. [Kazakov S.P., Reshetnyak D.V., Davydova N.V., Putkov S.B. Evaluation of the effectiveness of the humoral immune response after vaccination with "CoviVac". *Medicinskij alfavit = Medical Alphabet, 2022, no. 6, pp. 18–24. (In Russ.)*] *doi: 10.33667/2078-5631-2022-6-18-24*
7. Казаков С.П., Давыдова Н.В., Путков С.Б., Решетняк Д.В., Аристархова И.В.Длительность и интенсивность гуморального иммунного ответа у медицинских работников, перенесших COVID-19 // Медицинский вестник ГВКГ им. Н.Н. Бурденко. 2021. Т. 2, № 4 (6). С. 29–37. [Kazakov S.P., Davydova N.V., Putkov S.B., Reshetnyak D.V., Aristarchova I.V. Analysis of the duration and intensity of the humoral immune response in medical workers after COVID-19. *Meditsinskiy vestnik GVKG imeni N.N. Burdenko = Medical Bulletin of the Main Military Clinical Hospital named after N.N. Burdenko, 2021, vol. 2, no. 4 (6), pp. 29–37. (In Russ.)*] *doi: 10.53652/2782-1730-2021-2-4(6)-29-37*
8. Письмо Минздрава России от 29.06.2021 N 30-4/И/2-9825 «О порядке проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19» (вместе с «Временными методическими рекомендациями "Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19"»). М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021. [Letter of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 06/29/2021 No. 30-4/1/2-9825 «On the procedure for vaccination of the adult population against COVID-19» (with «Temporary guidelines "The procedure for vaccination of the adult population against COVID-19"»). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2021.]
9. Dom Bourian M.G., Annen K., Huey L., Andersen G., Merkel P.A., Jung S., Dominguez S.R., Knight V. Analysis of COVID-19 convalescent plasma for SARS-CoV-2 IgG using two commercial immunoassays. *J. Immunol. Methods, 2020, vol. 486: 112837. doi: 10.1016/j.jim.2020.112837*
10. Ignatiev S.A., Alekseev I.B., Kazakov S.P., Nam Yu.A., Listratov A.I. Some features of the development of AMD and other diseases of the posterior pole associated with the virus carrier and the novel coronavirus disease COVID-19. *International Journal of Clinical and Experimental Medical Sciences, 2021, vol. 7, no. 5, pp. 127–137. doi: 10.11648/j.ijcems.20210705.11*
11. Dimeglio C., Herin F., Martin-Blondel G., Miedougé M., Izopet J. Antibody titers and protection against a SARS-CoV-2 infection. *J. Infect., 2022, vol. 84, no. 2, pp. 248–288. doi: 10.1016/j.jinf.2021.09.013*
12. Feng S., Phillips D.J., White T., Sayal H., Aley P.K., Bibi S., Dold C., Fuskova M., Gilbert S.C., Hirsch I., Humphries H.E., Jepson B., Kelly E.J., Plested E., Shoemaker K., Thomas K.M., Vekemans J., Villafana T.L., Lambe T., Pollard A.J., Voysey M.; Oxford COVID Vaccine Trial Group. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med., 2021, vol. 27, no. 11, pp. 2032–2040. doi: 10.1038/s41591-021-01540-1*
13. Komissarov A.A., Dolzhikova I.V., Efimov G.A., Logunov D.Y., Mityaeva O., Molodtsov I.A., Naigovzina N.B., Peshkova I.O., Shcheblyakov D.V., Volchkov P., Gintsburg A.L., Vasilieva E. Boosting of the SARS-CoV-2-specific immune response after vaccination with single-dose sputnik light vaccine. *J. Immunol., 2022, vol. 208, no. 5, pp. 1139–1145. doi: 10.1101/2021.10.26.21265531*
14. Khoury D.S., Cromer D., Reynaldi A., Schlub T.E., Wheatley A.K., Juno J.A., Subbarao K., Kent S.J., Triccas J.A., Davenport M.P. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med., 2021, vol. 27, no. 7, pp. 1205–1211. doi: 10.1038/s41591-021-01377-8*
15. Luchsinger L.L., Ransegnola B., Jin D., Muecksch F., Weisblum Y., Bao W., George P.J., Rodriguez M., Tricoche N., Schmidt F., Gao C., Jawahar S., Pal M., Schnall E., Zhang H., Strauss D., Yazdanbakhsh K., Hillyer C.D., Bieniasz P.D., Hatziioannou T. Serological assays estimate highly variable SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity in recovered COVID-19 patients. *J. Clin. Microbiol., 2020, vol. 58, no. 12: e02005-20. doi: 10.1128/JCM.02005-20*

16. 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., ShcherbininD.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*
17. Muecksch F., Wise H., Batchelor B.,Squires M., Semple E., Richardson C., McGuire J., Clearly S., Furrie E., Greig N., Hay G., Templeton K., Lorenzi J.C.C., Hatziioannou T., Jenks S., Bieniasz P.D. Longitudinal serological analysis and neutralizing antibody levels in coronavirus disease 2019 convalescent patients. *J. Infect. Dis., 2021,vol. 223, no. 3, pp. 389–398. doi: 10.1093/infdis/jiaa659*
18. Meschi S., Colavita F., Bordi L., Matusali G., Lapa D., Amendola A., Vairo F., Ippolito G., Capobianchi M.R., Castilletti C.; INMICovid-19 laboratory team. Performance evaluation of Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test. *J. Clin. Virol., 2020, vol. 129: 104539. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104539*
19. Rossi A.H., Ojeda D.S., Varese A., Sanchez L., Gonzalez Lopez Ledesma M.M., Mazzitelli I., Alvarez Juliá A., Oviedo Rouco S., Pallarés H.M., Costa Navarro G.S., Rasetto N.B., Garcia C.I., Wenker S.D., Ramis L.Y., Bialer M.G., de Leone M.J., Hernando C.E., Sosa S., Bianchimano L., Rios A.S., Treffinger Cienfuegos M.S., Caramelo J.J., Longueira Y., Laufer N., Alvarez D.E., Carradori J., Pedrozza D., Rima A., Echegoyen C., Ercole R., Gelpi P., Marchetti S., Zubieta M., Docena G., Kreplak N., Yanovsky M., Geffner J., Pifano M., Gamarnik A.V. Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose. *Cell. Rep. Med., 2021, vol. 2, no. 8: 100359. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100359*
20. Van Kampen J.J.A., van de Vijver D.A.M.C., Fraaij P.L.A.,Haagmans B.L., Lamers M.M., Okba N., van den Akker J.P.C., Endeman H., Gommers D.A.M.P.J., Cornelissen J.J., Hoek R.A.S., van der Eerden M.M., Hesselink D.A., Metselaar H.J., Verbon A., de Steenwinkel J.E.M., Aron G.I., van Gorp E.C.M, van Boheemen S., Voermans J.C., Boucher C.A.B., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., Geurtsvankessel C., van der Eijk A.A. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat. Comm., 2021, vol. 12, no. 1: 267. doi.org/10.1038/s41467-020-20568-4*

Авторы:
Казаков С.П., д.м.н., доцент, зав. кафедрой медицинской биохимии и иммунопатологии Академического образовательного центра фундаментальной и трансляционной медицины ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия; начальник центра клинической лабораторной диагностики — главный лаборант ФГБУ Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко Минобороны России, Москва, Россия;
Решетняк Д.В., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики отделения клинических инфекционно-иммунологических исследований ФГБУ Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко Минобороны России, Москва, Россия;
Давыдова Н.В., врач клинической лабораторной диагностики отделения клинических инфекционно-иммунологических исследований ФГБУ Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко Минобороны России, Москва, Россия;
Ефимушкина О.А., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики, зав. лабораторным отделом ГБУЗ Диагностический клинический центр № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия
Путков С.Б., зав. отделением клинических инфекционно-иммунологических исследований, врач клинической лабораторной диагностики центра клинической лабораторной диагностики ФГБУ Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко Минобороны России, Москва, Россия.

Authors:
Kazakov S.P., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of Department of Medical Biochemistry and Immunopathology, Academic Educational Center of Fundamental and Translation Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Postgraduate Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; Head of Center for Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Reshetnyak D.V., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Clinical and Infectious-Immunological Research, Centre for Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Davydova N.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Clinical and Infectious-Immunological Research, Centre for Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Efimushkina O.A., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Head of the Laboratory Department, Diagnostic Clinical Center No.1 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation;
Putkov S.B., Head of the Department of Clinical and Infectious-Immunological Research of Centre for Clinical Laboratory Diagnostics, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.06.2022
Отправлена на доработку 20.08.2022
Принята к печати 19.03.2023

Received 10.06.2022
Revision received 20.08.2022
Accepted 19.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 481–496

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 481–496

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР: ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ

М.И. Попкова[1], О.В. Уткин[1], Е.Н. Филатова[1], Д.А. Брызгалова[1], Н.А. Сахарнов[1], Е.А. Соболева[2], Л.В. Назарова[3]

[1] *ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия*
[2] *ГБУЗ НО Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия*
[3] *ГБУЗ НО Инфекционная клиническая больница № 23 г. Нижнего Новгорода, Нижний Новгород, Россия*

Резюме. *Введение.* Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — актуальная вирусная инфекция у детей. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является основным этиологическим агентом ИМ. ВЭБ классифицируется на два основных типа — ВЭБ-1 и ВЭБ-2. Помимо этого выделяют разные варианты вируса на основе отдельных генов, среди которых наибольшую известность получил ген *LMP-1* и кодируемый им онкобелок. До сих пор изучение клинической значимости генетического разнообразия вируса при ВЭБ-ИМ у детей в России не проводилось. Цель исследования — оценить взаимосвязь молекулярно-генетических вариантов LMP-1 ВЭБ с клинико-лабораторными проявлениями ИМ у детей. *Материалы и методы.* Материалом исследования послужили лейкоциты крови и слюна детей в возрасте 1–17 лет с ВЭБ-ИМ (n = 69). Всего исследовано 132 изолята ВЭБ. Для дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 в работе применялся оптимизированный нами ранее однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Определение нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* выполнено методом секвенирования по Сэнгеру с последующим анализом полученных сиквенсов с помощью программного обеспечения MEGA X. Для поиска взаимосвязи вариантов LMP-1 с клинико-лабораторными проявлениями ИМ (32 признака и 8 групп признаков) использован многофакторный анализ. *Результаты.* Установлено, что у всех детей идентифицирован только один тип вируса — ВЭБ-1. При этом степень выраженности клинических проявлений ВЭБ-ИМ у детей значительно варьировала (суммарно от 15,5 до 35,5 баллов). Молекулярно-генетический анализ последовательностей С-концевой области LMP-1 нижегородских изолятов ВЭБ продемонстрировал значительную гетерогенность вирусной популяции, которая не ограничивалась только их группировкой по известным вариантам. По частоте выявления доминирующим вариантом LMP-1 являлся *B95-8* (60,6±6,0% случаев), реже встречались другие варианты (*China 1*, *NC*, *Med*– и *China 1+B95-8*). Выявлено,

Адрес для переписки:
Попкова Мария Игоревна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (раб.), 8 906 352-60-15 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Contacts:
Mariia I. Popkova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office), +7 906 352-60-15 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Для цитирования:
Попкова М.И., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Соболева Е.А., Назарова Л.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса Эпштейна–Барр: взаимосвязь с клиническими особенностями инфекционного мононуклеоза у детей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 481–496. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-2121

Citation:
Popkova M.I., Utkin O.V., Filatova E.N., Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Soboleva E.A., Nazarova L.V. Molecular genetic characterization of the Epstein–Barr virus: a relationship with the clinical features of pediatric infectious mononucleosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 481–496. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-2121

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MGC-2121

что ВЭБ-ИМ протекал легче и с меньшей выраженностью синдрома интоксикации в случаях инфицирования вирусом, имеющим молекулярно-генетический профиль ВЭБ-1/*B95-8*, в частности ВЭБ-1/*B95-8*/E214D. Наоборот, профили ВЭБ-1/*Med*–, а также ВЭБ-1/*Med*–/L338S, ВЭБ-1/*Med*–/S229T, ВЭБ-1/*China 1*/L338S и ВЭБ-1/*NC*/S229T ассоциировались с более тяжелым течением инфекции. *Заключение.* Впервые выявлено влияние генетического разнообразия ВЭБ на клинические проявления ИМ у детей. В контексте решаемых в данном исследовании задач необходимо проведение более масштабных и системных исследований на разных территориях России.

Ключевые слова: *вирус Эпштейна–Барр, инфекционный мононуклеоз, ВЭБ-1, ВЭБ-2, LMP-1, секвенирование, ПЦР, геноварианты.*

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF THE EPSTEIN–BARR VIRUS: A RELATIONSHIP WITH THE CLINICAL FEATURES OF PEDIATRIC INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Popkova M.I.[a], Utkin O.V.[a], Filatova E.N.[a], Bryzgalova D.A.[a], Sakharnov N.A.[a], Soboleva E.A.[b], Nazarova L.V.[c]

[a] *Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhniy Novgorod, Russian Federation*

[b] *Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

[c] *Infectious Clinical Hospital No. 23, Nizhniy Novgorod, Russian Federation*

Abstract. *Introduction.* Infectious mononucleosis (IM) is an high priority viral infection in children. Epstein-Barr virus (EBV) is the main etiological agent of IM. EBV is classified into two main types — EBV-1 and EBV-2. In addition, different variants of the virus are isolated based on individual genes, among which the *LMP-1* gene and the oncoprotein it encodes are the most well known. So far, the study of the clinical significance of EBV genetic diversity in EBV-IM in children in Russia has not been conducted. The aim of the study was to evaluate a relationship between EBV LMP-1 molecular genetic variants and clinical and laboratory manifestations of IM in children. *Materials and methods.* The material of the study was presented by blood leukocyte and saliva samples of children aged 1–17 years with EBV-IM (n = 69). A total of 132 EBV isolates were studied. For differential detection of EBV-1/EBV-2, we used a previously optimized one-round PCR variant with electrophoretic detection of amplification products in agarose gel. The nucleotide sequences of the C-terminal region of the *LMP-1* gene were determined by Sanger sequencing followed by analysis of the obtained sequences using the MEGA X software. Multiple Factor Analysis was used to search for the relationship between LMP-1 variants and clinical and laboratory manifestations of IM (32 signs and 8 groups of signs). *Results.* It was established that only one type of virus, EBV-1, was identified in all children. At the same time, the severity of clinical manifestations of EBV-IM in children varied significantly (from 15.5 to 35.5 scores in total). Molecular genetic analysis of the sequences of the LMP-1 C-terminal region in Nizhny Novgorod region EBV isolates demonstrated a significant heterogeneity of the viral population, which was not limited only to their grouping according to known variants. According to the frequency of detection, B95-8 was the dominant variant of LMP-1 (60.6±6.0% of cases), other variants were less common (*China 1*, *NC*, *Med*– and *China 1+B95-8*). It was found that EBV-IM proceeded more easily and with less severity of the intoxication syndrome in cases of infection with a virus having the molecular genetic profile of EBV-1/B95-8, in particular EBV-1/B95-8/E214D. Conversely, EBV-1/*Med*–, as well as EBV-1/*Med*–/L338S, EBV-1/*Med*–/S229T, EBV-1/*China 1*/L338S and EBV-1/*NC*/S229T profiles were associated with more severe infection. *Conclusion.* For the first time, the influence of the genetic diversity of EBV on the clinical manifestations of IM in children was revealed. In the context of the tasks to be solved in this study, it is necessary to conduct a larger-scale and systemic studies in different territories of Russia.

Key words: *Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, EBV-1, EBV-2, LMP-1, sequencing, PCR, genovariants.*

Введение

Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — острое антропонозное вирусное заболевание, сопровождающееся лихорадкой, поражением ротоглотки, лимфатических узлов, печени и селезенки и специфическими изменениями гемограммы [8, 12]. В Российской Федерации (РФ) в последнее десятилетие отмечается значимый экономический ущерб, обусловленный ростом заболеваемости ИМ [9, 10, 21]. При этом в возрастной структуре заболевших по-прежнему преобладают дети до 14 лет [9]. Основным этиологическим агентом ИМ является вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), на долю которого приходится в среднем 76,6% случаев [5]. По литературным данным ИМ характеризуется выраженным полиморфизмом клинических проявлений. Описаны особенности клинического течения ИМ в зависимости от этиологии, в разрезе разных возрастных групп, а также в сравнении первичной ВЭБ-инфекции или ее реак-

тивации [1, 4, 5, 6, 11, 22, 23]. Однако остается недостаточно изученным вопрос о взаимосвязи различий клинико-лабораторных проявлений ИМ с молекулярно-генетическими характеристиками самого вируса.

Согласно современной таксономии вирусов ВЭБ относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocriptoviruses*, виду *Human gammaherpesvirus 4* [38]. Анализ мировой литературы показал, что популяция ВЭБ отличается выраженной генетической гетерогенностью [15]. Единой, унифицированной системы, учитывающей все генетическое разнообразие ВЭБ, не существует. Основной классификацией остается разделение вируса на два типа — ВЭБ-1 и ВЭБ-2 (на основе последовательностей генов ядерного антигена вируса, а именно *EBNA-2* и *EBNA-3*) [32, 33, 36, 43]. Показано, что разные типы вируса отличаются по географическому распределению, тропности к В- и Т-клеткам, фенотипическим характеристикам *in vitro* [25, 26, 30, 31, 36, 43, 44, 48]. Информации о связи заболеваний с определенным типом ВЭБ недостаточно. В РФ изучение типов ВЭБ ограничивается единичными работами, посвященными только оценке распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди взрослого условно здорового населения [3, 20].

Основное внимание зарубежных и российских исследователей сосредоточилось на изучении структурно-функционального полиморфизма наиболее вариабельного участка генома ВЭБ — гена латентного мембранного протеина 1 *(LMP-1)* и кодируемого им одноименного онкобелка, а также поиске САО-подобных изолятов вируса в контексте ВЭБ-ассоциированных онкологических заболеваний у взрослых [2, 7, 17, 19, 24, 28, 37, 39, 46]. Преимущественно использовалась наиболее популярная классификация вариантов ВЭБ по R.H. Edwards и соавт., основанная на характерных аминокислотных (а.к.) паттернах С-концевой области LMP-1 [34]. В современный период достаточно широко изучаются особенности распространения вариантов LMP-1 на разных территориях при широком спектре доброкачественных и злокачественных заболеваний, продолжается интенсивный поиск генетических подтипов ВЭБ высокого онкогенного риска. При этом вопросу изучения молекулярно-генетической характеристики вируса при ВЭБ-инфекции у детей уделяется недостаточно внимания. Оценка клинической значимости генетического разнообразия ВЭБ при ИМ у детей в РФ до сих пор не проводилась.

Цель исследования — оценить взаимосвязь молекулярно-генетических вариантов LMP-1 ВЭБ с клинико-лабораторными проявлениями ИМ у детей.

Материалы и методы

Характеристика групп исследования. Проведен молекулярно-генетический анализ 132 изолятов ВЭБ из лейкоцитов крови и слюны, полученных от 69 детей в возрасте 1–17 (медиана 5 [2; 10]) лет, находившихся на лечении в ГБУЗ НО «Детская инфекционная больница № 8 г. Нижнего Новгорода» с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, вызванный ВЭБ» (ВЭБ-ИМ).

Соблюдение этических требований. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинской организации. Работа получила одобрение на заседании локального этического комитета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Протокол № 3 от 11.11.2021 г.).

Сбор биологического материала. Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная К3ЭДТА, и нестимулированная смешанная слюна (далее слюна). В работе использовались остаточные количества образцов цельной крови, полученных для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике. Сбор биоматериала производили однократно при поступлении в стационар.

Определение ДНК ВЭБ. Для получения фракции лейкоцитов периферической крови использовали реагент «Гемолитик» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Пробоподготовку слюны выполняли оптимизированным нами ранее способом [16]. Выделение тотальной нуклеиновой кислоты проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) с модификациями [14, 16]. Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови и слюне выполняли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол на всех этапах ПЦР-РВ соблюдали согласно инструкции производителя.

Дифференциальная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2 методом ПЦР. Для раздельной детекции основных типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) применен оптимизированный нами ранее вариант однораундовой ПЦР на основе гена *EBNA-2* [14, 16].

ПЦР-анализ фрагмента гена LMP-1 ВЭБ. Положительные образцы, содержащие ДНК

ВЭБ (по результатам ПЦР-РВ), были использованы для амплификации С-концевого фрагмента гена *LMP-1* вируса методом ПЦР. ПЦР-анализ проводили не в двухраундовой «полугнездовой» ПЦР, описанной в статье M.K. Smatti и соавт. [47], а в однораундовом варианте. При этом использовали праймеры, ранее предназначавшиеся для первого раунда: A1 5′-AGT CAT AGT AGC TTA GCT GAA-3′ и A2 5′-CCA TGG ACA ACG ACA CAG T-3′ [47]. Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкМ в реакцию) (ДНК-синтез, Россия); 5-кратный Taq Red буфер 12,5 мМ Mg^{2+} («Евроген», Россия); 5 е.а. Taq-F ДНК-полимеразы (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,1 мМ) (Евроген, Россия); деионизированную воду I типа (Milli-Q Integral 3, Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию. Условия амплификации: инициация 95°C – 15 мин, 40 циклов (95°C – 5 мин, 53°C – 1 мин, 72°C – 1 мин.), финальная элонгация 72°C – 10 мин. Амплификацию проводили на амплификаторе MaxyGene Gradient (Axygen, США). В результате амплифицировали фрагмент С-концевой области гена *LMP-1* размером 602 п.н. [47]. Продукты ПЦР-амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему). Результаты детектировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного обеспечения GeneSys (Syngene, Великобритания).

Секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена LMP-1 ВЭБ. Выделение и очистку полученных ампликонов *LMP-1* из агарозного геля проводили с помощью коммерческого набора «ФБиоГель» (Фрактал Био, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Конечный объем элюата составил 30 мкл. Концентрацию очищенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Eppendorf BioPhotometer plus (Eppendorf, Германия). В среднем количество ДНК составляло 150–300 нг на образец. Для реакции мечения прямой и обратной последовательностей ДНК флуоресцентными терминальными нуклеотидами использовался набор «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Лабораторный протокол на всех этапах анализа соблюдали согласно инструкции производителя. Очистку меченой ДНК *LMP-1* от компонентов реакционной смеси проводили с использованием ацетата натрия (pH = 7,0) и изопропанола. Очищенный фрагмент элюировали в 20 мкл HiDi формамида (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидных последовательностей ДНК *LMP-1* осуществлялось на генетическом анализаторе AB-3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием оригинального программного обеспечения 3500 Data Collection Software v. 1.0.

Биоинформационный анализ. Биоинформационный анализ данных проводился с помощью открытого программного обеспечения MEGA X (Mega Software, США)[1]. Полученные исходные нуклеотидные последовательности выравнивались по алгоритму ClustalW. В качестве референсных служили полученные из базы данных GenBank[2] последовательности анализируемого участка гена *LMP-1* штаммов B95-8 (V01555.2), *China 1* (AY337723.1), *China 2* (AY337724.1), *Med–* (AY337721.2), *Med+* (AY337722.2), *NC* (AY337726.2), *Alaskan* (AY337725.1). Нуклеотидные последовательности полученных изолятов ВЭБ и референтов транслировались в аминокислотные последовательности по стандартному генетическому коду. Принадлежность исследуемых последовательностей LMP-1 к определенным вариантам в рамках классификации R.H. Edwards и соавт. [34] устанавливалась по наличию сигнатурных аминокислотных замен (согласно табл. 1 в [34]).

Полученные нуклеотидные последовательности нижегородских изолятов ВЭБ от больных ВЭБ-ИМ детей депонированы в базе данных GenBank/NCBI от 09.08.2022 г. под регистрационными номерами OP105256-OP105376.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ выполнен на основе языка программирования R версия 4.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc)[3] и среды RStudio версия 2022.02.0+443 «Prairie Trillium» Release (RStudio, PBC)[4]. Числовые данные описывали в виде Me [Q1; Q3], где Me — медиана, а Q1 и Q3 — первый и третий квартиль соответственно. Долю описывали с указанием стандартного отклонения процентной доли (P±σp), в %. Наличие взаимосвязей между факторными переменными оценивали с применением точного теста Фишера. Различия значений количественных переменных в группах сравнения оценивали с применением рангового критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные

[1] URL: https://www.megasoftware.net
[2] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
[3] URL: https://www.R-project.org
[4] URL: http://www.rstudio.com

сравнения. Различия анализируемых признаков описывали с указанием Δ (ДИ = CI.ll–CI.ul), где Δ — разница положений распределений, CI.ll и CI.ul — нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала (ДИ) разницы. Результат считали статистически значимым при скорректированном $p < 0,05$.

При оценке взаимосвязи особенностей клинического течения ВЭБ-ИМ с молекулярно-генетическими вариантами LMP-1 вируса из всей совокупности клинико-лабораторных данных о каждом пациенте поэтапно по разработанному нами алгоритму были выделены три категории признаков: исходные, анализируемые и значимые. На первом этапе исходные качественные параметры (клинические симптомы) выражали в ранговых единицах (категориях) 0/1/2, при этом оценку степени тяжести проводили по алоритму О.А. Поповой и соавт. [13], где 0 обозначал отсутствие или слабо выраженный признак, 1 — умеренно выраженный признак, 2 — значительно выраженный признак. Количественные параметры (результаты лабораторных исследований) для нивелирования возможных различий, обусловленных полом и возрастом пациентов, также выражали в категориях (–1)/0/1, где (–1) соответствовал значениям ниже возрастной и половой нормы, 0 — значениям в пределах возрастной и половой нормы, 1 — значениям, превышающим возрастную и половую норму.

По результатам нормализации неизменяющиеся признаки из последующего анализа исключались. Оценка взаимосвязи проводилась на основе анализируемых параметров (32 признака и сформированные из них 8 групп признаков), представленных в табл. 1.

Для оценки комплекса анализируемых признаков применяли множественный факторный анализ (Multiple Factor Analysis, МФА) [27]. При этом использовали два первых измерения (две первые компоненты), суммарно объясняющих 32,36% дисперсии. Значимость переменных групп признаков и каждого признака по отдельности оценивали, анализируя их вклад (contribution). Значимыми считали переменные, чей вклад в компоненты превышал средний рассчитанный (вклад, который делала бы каждая переменная при условии равенства их значимости). Незначимые переменные из дальнейшего анализа исключали.

Среди полученных и охарактеризованных по вариантам (согласно классификации R.H. Edwards и соавт. [34]) и субвариантам (на основе выявленных делеций, аминокислотных замен и числа тандемных повторов) нижегородских изолятов ВЭБ для последующего анализа отбирали только такие, которые выявлялись у трех и более больных детей. Для каждого варианта и субварианта LMP-1 оценивали различия суммы баллов по группам признаков или по совокупности установленных значимых признаков. Баллы признаков суммировали по модулю.

Результаты

Молекулярно-генетическая характеристика ВЭБ у детей при ВЭБ-ИМ

Анализ молекулярно-генетического разнообразия нижегородских изолятов ВЭБ из лейкоцитов крови и слюны детей при ВЭБ-ИМ проводился по нескольким направлениям: определение типа вируса, варианта и субварианта LMP-1. По результатам типирования ВЭБ на основе гена *EBNA-2* была выявлена принадлежность всех полученных изолятов только к одному типу вируса — ВЭБ-1.

Также во всех положительных на ДНК ВЭБ (по результатам ПЦР-РВ) пробах была проведена амплификация С-концевого фрагмента гена *LMP-1* с последующим секвенированием продуктов ПЦР-реакции. Всего было получено 123 сиквенса С-концевого фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ от 66 пациентов с ВЭБ-ИМ. Результативность секвенирования ДНК из лейкоцитов крови и слюны составила 93,2% (123 из 132 анализированных последовательностей). Для последующего анализа полученные нуклеотидные последовательности были транслированы в аминокислотные.

На основе классификации ВЭБ по R.H. Edwards и соавт. [34] в нижегородских изолятах вируса у детей с ВЭБ-ИМ было выявлено 4 из 7 известных вариантов LMP-1, а именно: *B95-8*, *China 1*, *NC* и *Med*. Отметим, что изоляты LMP-1 *Med* были представлены исключительно вариантом *Med–* (не содержащий САО-подобную делецию 10 а.к. в координатах 346–355 а.к.). Варианты LMP-1 *Med+*, *China 2*, *China 3* и *Alaskan* не были обнаружены ни в одном исследованном образце.

По частоте выявления доминирующим вариантом являлся *B95-8* (60,6±6,0% детей с ВЭБ-ИМ). Значительно реже встречались варианты *China 1* (16,7±4,6%), *NC* (16,7±4,6%) и *Med–* (4,5±2,5%). Коинфицирование разными вариантами (в лейкоцитах крови — *China 1*, в слюне — *B95-8*) было установлено только в одном случае ВЭБ-ИМ. У остальных пациентов на момент постановки диагноза в лейкоцитах крови и слюне был выявлен один и тот же вариант LMP-1.

Последующий анализ последовательностей С-концевого участка LMP-1 нижегородских изолятов ВЭБ продемонстрировал выраженное молекулярно-генетическое разнообразие за счет вариабельности области тандемных повторов, наличия делеций и аминокислотных замен (табл. 2).

Таблица 1. Группировка анализируемых клинических и лабораторных признаков ВЭБ-ИМ у детей и их обозначение

Table 1. Grouping of analyzed clinical and laboratory signs of EBV-IM in children and their designation

Группа признаков и ее обозначение Group of signs and its designation	**Клинические и лабораторные признаки** Clinical and laboratory signs	**Обозначение признаков** Signs designation
Биохимические показатели крови — БХ Biochemical blood indicators — BC	**Глюкоза** Glucose	01
Синдром цитолиза — ЦИТ Cytolysis syndrome — CYT	**Аланинаминотрансфераза** Alanine aminotransferase	02
	Аспартатаминотрансфераза Aspartate aminotransferase	03
	Билирубин общий Bilirubin total	04
	Билирубин прямой Bilirubin direct	05
	Билирубин непрямой Bilirubin indirect	06
Гепатоспленомегалия — ГС Hepatosplenomegaly — HS	**Увеличение размера печени** Liver enlargement	07
	Увеличение размера селезенки Spleen enlargement	08
Лимфаденопатия — ЛА Lymphadenopathy — LA	**Увеличение лимфатических узлов** Lymph nodes enlargement	09
Гематологические показатели — ГЕМ Hematological indicators — HEM	**Эритроциты** Erythrocytes	10
	Тромбоциты Platelets	11
	Гемоглобин Hemoglobin	12
	Скорость оседания эритроцитов Erythrocytes sedimentation rate	13
Синдром поражения рото- и носоглотки — ТОН Syndrome of oropharyngeal and nasopharyngeal lesions — TON	**Отечность лица** Puffiness of the face	14
	Увеличение миндалин Tonsil enlargement	15
	Гиперемия Hyperemia	16
	Налеты Plaques	17
	Заложенность носа Nasal congestion	18
	Храп Snore	19
Синдром интоксикации — ТОКС Syndrome of intoxication — TOX	**Вялость** Lethargy	20
	Беспокойство Anxiety	21
	Снижение аппетита Decreased appetite	22
	Нарушение сна Sleep disturbance	23
	Приглушенные тоны сердца Muffled heart sounds	24
	Тахикардия Tachycardia	25
	Рвота Vomit	26

Группа признаков и ее обозначение Group of signs and its designation	Клинические и лабораторные признаки Clinical and laboratory signs	Обозначение признаков Signs designation
Лейкоцитарные показатели — ЛЕЙ Leukocyte indicators — LEU	**Лейкоциты** Leukocytes	**27**
	Палочкоядерные нейтрофилы Stab neutrophils	**28**
	Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	**29**
	Моноциты Monocytes	**30**
	Лимфоциты Lymphocytes	**31**
	Ядерный индекс интоксикации Nuclear Intoxication Index	**32**

На основе полученных данных были отобраны молекулярно-генетические характеристики LMP-1 ВЭБ, которые встречались у трех и более человек. Именно они составили основные анализируемые субварианты. Одни из них отличались специфичностью для конкретного варианта LMP-1, обусловливая внутри- и межвариантные различия в исследуемой области гена, другие были вариант-независимыми (выявлялись с разной частотой в нескольких вариантах вируса). Так, в число анализируемых вариант-специфичных характеристик нижегородских изолятов LMP-1 *B95-8* вошли аминокислотные замены D209H, E214D, E328Q, G354S. Наоборот, аминокислотная замена S309N и делеция 5 а.к. (а.к. 276–280) присутствовали во всех нижегородских изолятах *China 1*, *Med–* и *NC*, но не в *B95-8*. Только в последовательностях *China 1* были обнаружены делеция 10 а.к. (а.к. 346–355) и аминокислотные замены E214Q, Q332N, а в *NC* — L306Q, S313P, Q322T, L338P, G335D и D250N+G331Q+H358P. Независимо от варианта LMP-1 встречались такие мутации как G212S (B95-8, *China 1*, *Med–*, *NC*), S229T (*Med–*, *NC*), Q334R (*China 1*, *Med–*, *NC*), L338S (*China 1*, *Med–*), H352R (B95-8, *Med–*), а также тандемные повторы ≤ 4,5 или ≥ 5,0.

Таблица 2. Молекулярно-генетическая характеристика С-концевой области LMP-1 нижегородских изолятов ВЭБ от детей при инфекционном мононуклеозе (относительно прототипного штамма *B95-8*)
Table 2. Molecular and genetic characteristics of LMP-1 C-terminal region in Nizhny Novgorod region EBV isolates from children with infectious mononucleosis (relative to the prototype strain *B95-8*)

		Варианты LMP-1 ВЭБ/EBV LMP-1 variants			
		B95-8 **(n = 40)**	***China 1*** **(n = 11)**	***Med–*** **(n = 3)**	***NC*** **(n = 11)**
Референсные последовательности Reference sequences	**Номер регистрации в GenBank** GenBank accession number	V01555.2	AY337723.1	AY337721.2	AY337726.2
	Аминокислотные замены Amino acid substitutions	**Прототипный штамм с нулевым уровнем мутаций** Zero Mutation Prototype Strain	G212S S309N Q322N Q334R L338S S366T	S229T S309N Q322E Q334R L338S H352R S366T	G212S L306Q S309N S313P Q322T G331Q L338P H352N H358P S366T
	Делеции Deletions		5 а.к. а.к. 276–280 10 а.к. а.к. 346–355 5 аа. аа. 276–280 10 аа. аа. 346–355	5 а.к. а.к. 276–280 5 аа. аа. 276–280	5 а.к. а.к. 276–280 5 аа. аа. 276–280
	Тандемные повторы Tandem repeats	4,5	4,0	4,0	4,0

Окончание таблицы 2. Молекулярно-генетическая характеристика С-концевой области LMP-1 нижегородских изолятов ВЭБ от детей при инфекционном мононуклеозе (относительно прототипного штамма *B95-8*)

Table 2. Molecular and genetic characteristics of LMP-1 C-terminal region in Nizhny Novgorod region EBV isolates from children with infectious mononucleosis (relative to the prototype strain *B95-8*) (continued)

		Варианты LMP-1 ВЭБ/EBV LMP-1 variants			
		B95-8 **(n = 40)**	***China 1*** **(n = 11)**	***Med–*** **(n = 3)**	***NC*** **(n = 11)**
Нижегородские изоляты ВЭБ EBV isolates from Nizhny Novgorod region	**Перечень аминокислотных замен (n)** List of amino acid substitutions (n)	A207P (1) D209H (5) D210A (1) D210Y (1) G212S (37) E214D (3) E214K (2) E214N (1) H225R (2) G243A (1) D250N (1) G252A (1) D296E (1) G315E (1) D317Y (1) E328Q (40) D349N (2) G351S (1) H352K (1) H352R (2) G354S (3) G355N (1) G355V (1) D356N (1) P357S (1) T361K (1) T361M (1) L364W(1) S366A (1) S366T (39)	**G212S (11)** E214Q (5) D288G (1) **S309N (11)** D317Y (1) **Q322N (11)** E326D (2) **Q334R (11)** **L338S (11)** S366A (1) **S366T (11)**	G212S (3) **S229T (3)** G246E (1) G252A (1) D277G (2) D282G (2) N289D (1) D293G (1) D304G (1) **S309N (3)** Q322D (1) **Q322E (2)** V327D (1) D333H (1) Q334K (1) **Q334R (2)** P337A (1) **L338S (3)** D349N (1) **H352R (2)** **S366T (3)**	**G212S(11)** S229T (2) G243A (1) D250N (10) **L306Q (11)** **S309N (11)** **S313P (11)** **Q322T (11)** **G331Q (10)** Q334R (2) G335D (5) **L338P (11)** **H352N (9)** **H358P (9)** P357Q (1) T361M (1) **S366T (11)** G368S (1)
	Делеции (n) Deletions (n)	21 а.к. (1) а.к. 335–355 21 аа. (1) аа. 335–355	**5 а.к.** (11) а.к. 276–280 **10 а.к.** (11) а.к. 346–355 **5 аа.** (11) аа. 276–280 **10 аа.** (11) аа. 346–355	2 а.к. (1) а.к. 215–216 **5 а.к.** (3) а.к. 276–280 2 аа. (1) аа. 215–216 **5 аа.** (3) аа. 276–280	**5 а.к.** (11) а.к. 276–280 **5 аа.** (11) аа. 276–280
	Тандемные повторы (n) Tandem repeats (n)	**4,5** (38) 5,5 (2)	3,0 (1) 5,0 (9) 6,0 (1)	**4,0** (1) 5,0 (1) 7,0 (1)	3,0 (5) 3,5 (1) **4,0** (3) 6,0 (2)

Примечание. Жирным шрифтом выделены молекулярно-генетические признаки, которые совпадали с соответствующей референсной последовательностью. В скобках указано число пациентов (n).

Note. Molecular genetic characteristics that matched the corresponding reference sequence are shown in bold. The number of patients is shown in parentheses (n).

Оценка взаимосвязи вариантов и субвариантов LMP-1 ВЭБ с клинико-лабораторными проявлениями ВЭБ-ИМ у детей

Клиническая картина ВЭБ-ИМ у детей характеризовалась типичным течением. Такие ведущие синдромы как лихорадка, интоксикация, лимфаденопатия и поражение рото- и носоглотки присутствовали у всех пациентов, гепатоспленомегалия развилась у 91,3±3,4% детей. Несмотря на то, что все анализируемые случаи ВЭБ-ИМ у детей были ассоциированы только с ВЭБ-1, применение алгоритма балльной оценки степени тяжести ИМ, разработанного О.А. Поповой и соавт. [13] показало, что выраженность отдельных клинических и лабораторных признаков ИМ и рассчитанная сумма баллов степени тяжести заболевания индивидуально для каждого пациента варьировала от 15,5 до 35,5 баллов. Кроме того, у 8,7±3,4% детей с общей суммой баллов, равной 29,0 и выше, была верифицирована тяжелая форма заболевания. Остальные дети перенесли ВЭБ-ИМ средней степени тяжести (оценивается в интервале от 15,0 до 28,0 баллов).

Полученные данные о различной выраженности клинических и лабораторных признаков ВЭБ-ИМ у наблюдаемых нами детей стали предпосылками для продолжения исследований, направленных на поиск взаимосвязи особенностей клинического течения инфекции и генетической гетерогенности вирусной популяции ВЭБ-1. Мы предполагали, что симптомы заболевания и тяжесть их проявлений могут быть обусловлены известными вариантами LMP-1, а также другими молекулярно-генетическими характеристиками вируса, которые не ограничиваются только их группировкой по вариантам, описанным в классификации R.H. Edwards и соавт. [34].

По разработанному нами алгоритму была проведена оценка взаимосвязи выявленных молекулярно-генетических характеристик ВЭБ с особенностями проявлений ВЭБ-ИМ у детей по 32 анализируемым признакам и 8 группам признаков (табл. 1). На первом этапе исследования МФА показал, что в рамках двух первых компонент выделяются два ключевых фактора, ассоциированных с различиями клинико-лабораторных проявлений ВЭБ-ИМ: возраст пациента и вариант вируса (рис. 1). Как видно на рис. 1, в координатах двух первых компонент пациенты младшей (до 6 лет) и старшей (6 и более лет) возрастных групп формировали противопоставленные кластеры с барицентрами во втором и четвертом квадрантах. Вдоль оси второй компоненты наблюдали формирование субкластеров пациентов, инфицированных разными вариантами LMP-1 ВЭБ. Таким образом, рис. 1 демонстрирует, что первая компонента характеризует разнообразие клинических и лабораторных признаков ВЭБ-ИМ у пациентов в зависимости от возраста, а вторая — в зависимости от инфицирующего варианта вируса.

Далее нами были проанализированы клинико-лабораторные признаки, вносившие значимый вклад в формирование второй компоненты. В результате показано, что в ее формирование значимый вклад внесли такие группы признаков как синдром интоксикации и гематологические показатели (рис. 2А), а также значимые переменные признаки: концентрация гемоглобина, увеличение лимфоузлов, беспокойство, отечность лица, снижение аппетита, нарушение сна, вялость, уровень глюкозы, увеличение селезенки и количество моноцитов (рис. 2Б).

Обобщая полученные данные МФА (рис. 1 и рис. 2А), отметим, что в контексте первой компоненты возраст пациента оказывает влияние преимущественно на степень выраженности цитолитического синдрома, в то время как анализ второй компоненты указывает на то, что различные варианты LMP-1 детерминируют разную выраженность синдрома интоксикации. Основываясь на расположении барицентров пациентов в координатах второго измерения, инфицирование вариантами *China 1*

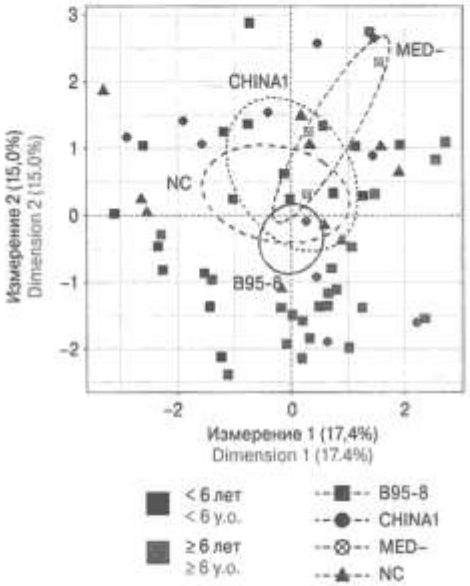


Рисунок 1. Расположение пациентов с ВЭБ-ИМ в координатах двух первых измерений. Эллипсами показан 95% доверительный интервал барицентра местоположений пациентов с соответствующим вариантом LMP-1 в координатах измерений

Figure 1. A position of patients with EBV-IM in the coordinates of the first two measurements. Ellipses show the 95% confidence interval of the barycenter of patient locations with the corresponding LMP-1 variant in measurement coordinates

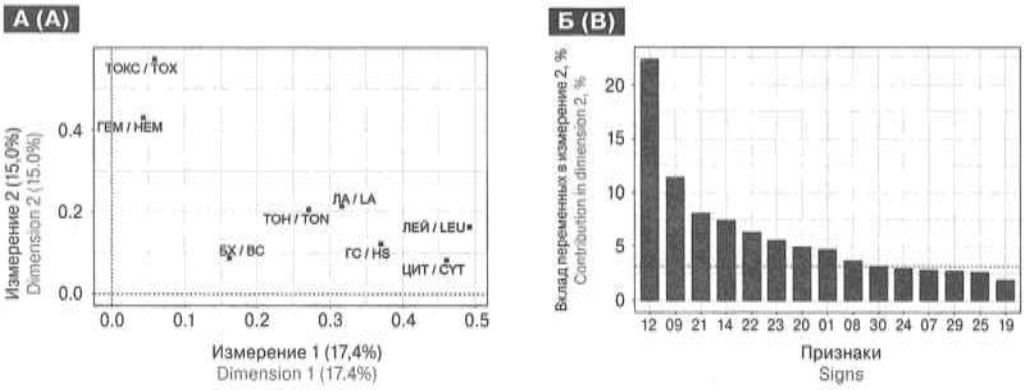


Рисунок 2. Характеристики групп признаков и значимых признаков ВЭБ-ИМ у детей

Figure 2. Characteristics of groups of signs and significant signs of EBV-IM in children

Примечание. А — расположение переменных групп признаков в координатах двух первых измерений. Б — вклад переменных признаков в состав второго измерения. Пунктирной линией обозначен уровень среднего рассчитанного вклада (3,1%). Отображены 15 переменных с наибольшим вкладом. Обозначения признаков и групп признаков представлено в таблице 1.

Note. A — the location of the variable groups of signs in the coordinates of the first two dimensions. B — the contribution of variable signs to the composition of the second dimension. The dotted line indicates the level of the average calculated contribution (3.1%). The 15 variable signs with the largest contribution are displayed. Designations of signs and groups of signs are presented in Table 1.

и *Med–* ассоциировано с наиболее выраженными, а *B95-8* — с наименее выраженными проявлениями синдрома интоксикации у детей.

На заключительном этапе проведена оценка различий выраженности клинико-лабораторных признаков и групп признаков, вносящих весомый вклад во вторую компоненту, у пациентов с различными вариантами и субвариантами LMP-1 ВЭБ. В результате выявлены статистически значимые различия (скорректированный $p < 0,05$) по сумме баллов синдрома интоксикации для варианта *B95-8* и субвариантов, содержащих аминокислотные замены E214D, L338S, а также по сумме баллов совокупности значимых признаков для вариантов *B95-8*, *Med–* и субвариантов с мутациями S229T, L338S (табл. 3).

Выявлено, что при инфицировании вариантом *B95-8* по сравнению с другими вариантами LMP-1 вируса, ВЭБ-ИМ у детей характеризовался менее выраженными проявлениями синдрома интоксикации и суммы баллов значимых признаков в целом, что соответствовало более легкому течению заболевания. При этом с еще меньшей выраженностью синдрома интоксикации были ассоциированы случаи ВЭБ-ИМ, вызванные субвариантом, содержащим аминокислотную замену E214D (выявлена в 8% последовательностей ДНК изолятов *B95-8*).

Наоборот, утяжеление синдрома интоксикации и проявлений одновременно всех значимых признаков ВЭБ-ИМ наблюдали у пациентов, инфицированных субвариантом, содержащим аминокислотную замену L338S (сигнатурная аминокислотная замена, характеризующая варианты *China 1* и *Med–*). Кроме того, при инфицировании вариантом *Med–* или субвариантом, содержащим аминокислотную замену S229T (выявлена в 100% изолятов *Med–* (сигнатурная замена) и 18% изолятов *NC*), сумма баллов всех значимых признаков ВЭБ-ИМ также была выше

Таблица 3. Различия суммы баллов всех значимых признаков и групп признаков ВЭБ-ИМ при инфицировании вирусом с разными молекулярно-генетическими характеристиками LMP-1

Table 3. Differences in the sum of scores of all significant signs and groups of signs of EBV-IM in case of infection with a virus with different molecular genetic characteristics of LMP-1

Вариант/субвариант Variant/Subvariant	**Δ (95% ДИ) (нет–есть)**/Δ (95% CI) (absent–present)	
	Сумма баллов всех значимых признаков Sum of scores of all significant signs	**Сумма баллов синдрома интоксикации** Sum of scores of intoxication syndrome
B95-8	2 (1–4)	2 (0–3)
Med–	–4 (–8 – 0)	–
E214D	–	3 (0–6)
S229T	–4 (–6 – –1)	–
L338S	–2 (–4 – 0)	–2 (–4 – 0)

Примечание. В таблице приведены только выявленные статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Note. Only significant differences are shown ($p < 0.05$).

по сравнению с другими вариантами или субвариантами LMP-1 ВЭБ. Суммарно доля случаев инфицирования вариантом *Med*– и субвариантами, несущими аминокислотные замены L338S и S229T, составила 24,6%. Дополнительно отметим, что только при инфицировании субвариантом LMP-1, несущим аминокислотную замену S229T, было установлено статистически значимое превышение в 7 раз концентрации вирусной ДНК в лейкоцитах крови по отношению к случаям ВЭБ-ИМ, вызванным вирусом с другими молекулярно-генетическими характеристиками (790 (95% ДИ: 39–2781) копий ДНК ВЭБ/10^5 клеток, p = 0,038). При этом медиана вирусной нагрузки составила 1105 [297; 2848] против 158 [70; 481] копий ДНК ВЭБ/10^5 клеток.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что особенности клинико-лабораторных проявлений ВЭБ-ИМ у детей могут зависеть от молекулярно-генетических характеристик вируса. При этом отдельные типичные признаки заболевания и степень их выраженности ассоциированы с конкретным вариантом или субвариантом LMP-1. В анализируемой группе детей ВЭБ-ИМ протекал легче и с меньшей выраженностью синдрома интоксикации в случаях инфицирования вирусом, имеющим молекулярно-генетический профиль (тип/вариант/субвариант) ВЭБ-1/*B95-8*, в частности ВЭБ-1/*B95-8*/E214D. В то время как ВЭБ-1/*Med*–, а также ВЭБ-1/*Med*–/L338S, ВЭБ-1/*Med*–/S229T, ВЭБ-1/*China 1*/L338S и ВЭБ-1/*NC*/S229T, по сравнению с другими вариантами вируса, были ассоциированы с более тяжелым течением инфекции.

Обсуждение

Особенности клинико-лабораторных проявлений ИМ при инфицировании разными типами и молекулярно-генетическими вариантами ВЭБ остаются мало изученным вопросом, особенно у детей. Впервые в РФ нами проведено исследование, посвященное оценке клинической значимости генетического разнообразия ВЭБ при ИМ.

Оптимизированный нами ранее методический подход к дифференциальной детекции ВЭБ-1 и ВЭБ-2 на основе метода ПЦР [14, 16] позволил оценить типовую структуру вируса при ВЭБ-ИМ у детей, проживающих в Нижегородской области. При этом во всех клинических случаях в лейкоцитах крови и в слюне был выявлен только ВЭБ-1. Тип ВЭБ-2 не был обнаружен ни в одном исследованном образце. Отметим, что в наших предыдущих исследованиях в нижегородской популяции встречались единичные случаи обнаружения ВЭБ-2 в лейкоцитах крови условно здоровых детей [14].

Полученные нами результаты соответствуют данным немногочисленных зарубежных публикаций, свидетельствующих о том, что ИМ чаще ассоциирован с типом ВЭБ-1 [25, 26, 41, 42]. Однако характеристика клинико-лабораторных особенностей ИМ при инфицировании разными типами вируса у детей отсутствует. Ранее сообщалось, что у лиц 14 лет и старше при инфицировании ВЭБ-1 активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотиансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы была значительно выше по сравнению с теми, у кого был выявлен ВЭБ-2 или коинфекция обоими типами вируса [42]. Основная часть исследований фенотипических характеристик ВЭБ-1 и ВЭБ-2 до сих пор была посвящена изучению их трансформирующей активности и роли в канцерогенезе [36, 44].

Классификация ВЭБ, основанная только на типах вируса, не позволяет полностью учитывать все его естественное разнообразие (современный обзор представлен в [15]). Полученные нами результаты оценки молекулярно-генетического разнообразия С-концевой области LMP-1 ВЭБ в крови и слюне детей с ВЭБ-ИМ, проживающих на территории Нижегородской области, значительно расширяют существующие представления о генетической гетерогенности вируса в целом.

Выявление четырех из семи охарактеризованных R.H. Edwards и соавт. вариантов LMP-1 *(B95-8, China 1, Med*– и *NC)* соответствовало описанному распределению в Европейской части России, с доминированием низкодивергентного варианта *B95-8* (данные по взрослым вирусоносителям) [2, 17, 19]. По данным зарубежной литературы, структура популяции и преобладающий вариант LMP-1 ВЭБ при ИМ у детей в разных географических регионах мира значительно варьируют, при этом определенного варианта LMP-1, ассоциированного только с ИМ, не выявлено [26, 35, 40, 41]. Как показали собственные исследования, возбудителем ИМ являлся, как правило, один из вариантов вируса. Коинфицирование разными вариантами LMP-1 при ВЭБ-ИМ у детей в проведенном нами исследовании было редким событием. Аналогичные результаты отражены в работах научно-исследовательских групп из Китая и Аргентины [25, 41]. Вместе взятые, они контрастируют с данными других авторов, указывающих на возможность множественного инфицирования разными штаммами ВЭБ, результаты которых были получены не с помощью методов секвенирования, а на основе применения гетеродуплексного анализа [35, 40].

Проведенный нами детальный анализ аминокислотных последовательностей позволил выявить широкий спектр мутаций С-концевой

области LMP-1 в нижегородских изолятах ВЭБ (в соответствии с табл. 2). Наиболее распространенные из них ранее были достаточно хорошо охарактеризованы в работах как зарубежных, так и российских исследователей. В первую очередь это относится к сигнатурным аминокислотным заменам, которые специфичны для разных вариантов LMP-1 [34]. Делеция 30 п.н., кодирующая 10 а.к. в координатах 346–355 а.к., известная своим высоким трансформирующим потенциалом *in vitro* и *in vivo*, была выявлена исключительно в штаммах *China 1* (100%), что соответствует его принадлежности к так называемым CAO-подобным штаммам. Наличие двойных аминокислотных замен G212S/S366T и уникальной E328Q в последовательностях LMP-1 *B95-8* ранее было описано как набор мутаций, характерных для российских изолятов ВЭБ (данные по взрослым здоровым вирусоносителям и онкологическим больным) [2, 17, 19].

В нашем исследовании продемонстрирована существенная вариабельность области тандемных повторов LMP-1 (а.к. 253–306) по числу (от 3,5 до 7,0) повторяющихся мотивов из 11 а.к. (идеальный мотив PQDPDNTDDNG) и аминокислотным заменам в них, а также по наличию и местоположению между ними мотива из 5 а.к. (PHDPL, а.к. 275–279). Только изоляты *Med–* имели типичное для них чередование идеальных и модифицированных (присутствует замена аспарагиновой кислоты на глицин в третьем положении аминокислоты в элементе — D277G, D282G, D293G, D304G) мотивов из 11 а.к. Отличительной особенностью нижегородских изолятов ВЭБ явилось то, что мотив из 5 а.к. (а.к. 275–279) отсутствовал во всех без исключения последовательностях *China 1*, *Med–* и *NC*. Отметим, что в работе зарубежных авторов данный мотив встречался в разных вариантах LMP-1 ВЭБ, в том числе в изолятах, установленных от детей с ИМ [41]. Значительная часть других выявленных в нашем исследовании мутаций встречались спорадически и остаются фенотипически не охарактеризованными.

Ранее только в одном исследовании была проведена оценка связи клинических особенностей ИМ у детей с разными молекулярно-генетическими характеристиками LMP-1 ВЭБ. Было показано, что повышение аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы происходило при инфицировании ВЭБ, у которого в тандемных последовательностях LMP-1 насчитывалось 3 или 4 повтора [26]. Однако в нашем исследовании эти данные не подтвердились. Кроме того, МФА показал, что на степень выраженности цитолитического синдрома оказывает влияние преимущественно возраст детей. Именно эта возрастная особенность наиболее часто отмечалась в многочисленных клинических наблюдениях за больными ИМ [1, 11, 22, 23]. А в одной из работ российских авторов было установлено, что достижение ребенком возраста 5,5 лет на фоне ВЭБ-инфекции приводит к повышению в 1,5 раза риска развития гепатита с синдромом цитолиза [11].

На основе проведенного МФА клинико-лабораторных показателей нами впервые были определены синдромы и отдельные признаки (симптомы) ВЭБ-ИМ у детей, выраженность которых обусловлена геновариантом вируса. В числе значимых были определены синдром интоксикации, а на уровне отдельных признаков — увеличение лимфоузлов, беспокойство, отечность лица, снижение аппетита, нарушение сна, вялость, увеличение селезенки, изменение концентрации гемоглобина, глюкозы и количества моноцитов. Кроме того, оценка влияния определенных вариантов и субвариантов LMP-1 вируса на течение ИМ позволила получить новые данные о клинической значимости генетического разнообразия ВЭБ. Установлено, что у пациентов, инфицированных вариантом LMP-1 *B95-8*, ВЭБ-ИМ протекает легче и с наименее выраженным синдромом интоксикации. В то время как инфицирование вариантом *Med–* и субвариантами, несущими аминокислотные замены L338S и S229T, было ассоциировано с более тяжелыми случаями заболевания, доля которых суммарно составила 24,6% (каждый четвертый из госпитализированных детей). Мутация L338S (присутствует в 100% штаммов *China 1* и *Med–*) к тому же была связана с более выраженными проявлениями интоксикации. Случаи инфицирования субвариантом ВЭБ, несущим мутацию S229T (встречалась в штаммах *Med–* и *NC*), отличались наибольшей вирусной нагрузкой в лейкоцитах крови. На наш взгляд, важным аспектом является изучение функциональных свойств именно этих мутаций, в том числе с учетом данных недавно проведенных масштабных исследований, продемонстрировавших повышенный риск развития злокачественных новообразований у лиц, перенесших ВЭБ-ИМ в анамнезе, особенно в тяжелой форме (был установлен более чем 10-кратный риск) [29, 45].

Заключение

Впервые в РФ проведена оценка клинической значимости генетического разнообразия ВЭБ при ИМ у детей.

Показано, что не только варианты LMP-1 ВЭБ как таковые, но и более детальные характеристики вируса (например, аминокислотные замены и другие) могут влиять на течение ВЭБ-ИМ.

Установлена взаимосвязь определенных вариантов и субвариантов LMP-1 ВЭБ, циркулирующих на территории Нижегородской области, с клинико-лабораторными проявлениями ИМ у детей. В анализируемой группе детей ВЭБ-ИМ протекал легче и с меньшей выраженностью синдрома интоксикации при инфицировании вирусом, имеющим молекулярно-генетический профиль ВЭБ-1/*B95-8*, в частности ВЭБ-1/*B95-8*/E214D. Случаи более тяжелого течения инфекции были ассоциированы с ВЭБ-1/*Med*–, ВЭБ-1/*Med*–/L338S, ВЭБ-1/*Med*–/S229T, ВЭБ-1/*China 1*/L338S и ВЭБ-1/*NC*/S229T (суммарно 24,6% госпитализированных пациентов).

По результатам проведенного исследования предлагается следующий алгоритм дифференциальной диагностики клинической значимости разных вариантов ВЭБ. На первом этапе методом МФА по двум первым осям определяют наличие различий между наборами нормализованных клинических и лабораторных признаков ИМ в зависимости от варианта ВЭБ. Далее выделяют группы симптомов и симптомы, обладающие максимальной значимостью для выявленных различий. На заключительном этапе, применяя методы традиционной статистики, исследуют различия значений наборов симптомов при инфицировании определенными вариантами ВЭБ.

Полученные результаты имеют важную практическую направленность, позволяя выявлять группы риска в зависимости от особенностей течения заболевания при инфицировании различными вариантами ВЭБ, а также с точки зрения оптимизации и индивидуализации ведения и лечения пациентов. Оценка генетического разнообразия ВЭБ лежит в основе перспективной разработки средств специфической профилактики и терапии ВЭБ-инфекции. В контексте решаемых в данном исследовании задач необходимо проведение более масштабных и системных исследований на разных территориях РФ с участием профильных специалистов научного и врачебного сообществ.

Список литературы/References

1. Антонова М.В., Кашуба Э.А., Дроздова Т.Г., Любимцева О.А., Ханипова Л.В., Огошкова Н.В., Чехова Ю.С. Сравнительная характеристика клинического течения и лабораторных данных первичной Эпштейна–Барр вирусной инфекции и ее реактивации у детей различных возрастных групп // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. 2016. Т. 2, № 3 (14). С. 19–24. [Antonova M.V., Kashuba E.A., Drozdova T.G., Lyubimtseva O.A., Khanipova L.V., Ogoshkova N.V., Chekhova Yu.S. Comparative characteristics of the clinical course and laboratory parameters of the primary and reactivation of Epstein–Barr virus infection in children of different ages groups. *Vestnik soveta molodykh uchonykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti = Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region, 2016, vol. 2, no. 3, pp. 19–24. (In Russ.)*]
2. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и у здоровых лиц // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 2. С. 11–17. [Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnov K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia, the infection of the population and the analysis of gene LMP1 variants at the patients with EBV-associated disease and at healthy patients. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 11–17. (In Russ.)*]
3. Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена LMP1 и злокачественные опухоли // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 3. С. 246–257. [Gurtsevitch V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V. Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, LMP1 oncogene variants, and malignancies. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 246–257. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0507-4088-120*
4. Демина О.И., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Тетова В.Б., Учаева О.Н. Клинические проявления инфекционного мононуклеоза при первичной или реактивированной герпесвирусной инфекции // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 1. С. 37–44. [Demina O.I., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tetova V.B., Uchaeva O.N. Clinical manifestations of infectious mononucleosis in primary or reactivated herpes virus infection. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 37–44. (In Russ.)*] *doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-1-37-44*
5. Демина О.И., Тихомиров Д.С., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Туполева Т.А. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии инфекционного мононуклеоза // Детские инфекции. 2020. Т. 19, № 2. С. 29–37. [Demina O.I., Tikhomirov D.S., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tupoleva T.A. Clinical relevance of virological verification methods for the etiology of infectious mononucleosis. *Detskie infektsii = Children Infections, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 29–37. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-2-29-37*
6. Демина О.И., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Тетова В.Б., Учаева О.Н. Инфекционный мононуклеоз у детей: клинико-лабораторная характеристика в зависимости от этиологии и фазы инфекционного процесса // Инфекционные болезни. 2020. Т. 18, № 3. С. 62–72. [Demina O.I., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tetova V.B., Uchaeva O.N. Infectious mononucleosis in children: clinical and laboratory characteristics depending on the disease etiology and phase of infection. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases, 2020, vol. 18, no. 3, pp. 62–72. (In Russ.)*] *doi: 10.20953/1729-9225-2020-3-62-72*

7. Дидук С.В., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Роль функционально значимых мутаций гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в активации клеточных сигнальных путей // Биохимия. 2008. Т. 73, № 10. С. 1414–1421. [Diduk S.V., Smirnova K.V., Pavlish O.A., Gurtsevitch V.E. Functionally significant mutationsin Epstein–Barr virus LMP1 gene and their role in activation of cell signaling pathways. *Biokhimiya = Biochemistry, vol. 72, no. 10, pp. 1414–1421. (In Russ.)*]
8. Мартынова Г.П., Кузнецова Н.Ф., Мазанкова Л.Н., Шарипова Е.В. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным инфекционным мононуклеозом. СПб., 2013. 70 с. [Martynova G.P., Kuznetsova N.F., Mazankova L.N., Sharipova E.V. Clinical recommendations (treatment protocol) for providing medical care to children with infectious mononucleosis. *St. Petersburg, 2013. 70 p. (In Russ.)*] *URL: http://niidi.ru/dotAsset/a6816d03-b0d9-4d37-9b09-540f48e3ed43.pdf6 (13.12.2022)*
9. Михнева С.А., Гришина Ю.Ю., Кухтевич Е.В., Мартынов Ю.В. Инфекционный мононуклеоз: характеристика проявлений эпидемического процесса // Инфекционные болезни: новости, мнение, обучение. 2017. № 5. С. 61–64. [Michneva S.A., Grishina Yu.Yu., Kukhtevich E.V., Martynov Yu.V. Infectious mononucleosis, epidemic process. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniye, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2017, no. 5, pp. 61–64. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2305-3496-2017-00086*
10. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. 256 с. [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2020: State report. *Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2021. 256 p. (In Russ.)*]
11. Пермякова А.В., Сажин А.В., Мелехина Е.В., Горелов А.В. Возможности биологического и математического моделирования инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр // Педиатрия. 2020. Т. 99, № 6. С. 226–231. [Permyakova A.V., Sazhin A.V., Melekhina E.V., Gorelov A.V. Possibilities of biological and mathematical modeling of the infection caused by Epstein–Barr virus. *Pediatria = Pediatrics, 2020, vol. 99, no. 6, pp. 226–231. (In Russ.)*] *doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-6-226-231*
12. Покровский В.Н., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 816 с. [Pokrovsky V.N., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. Infektsionnye bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]. *Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 816 p.*]
13. Попова О.А., Хохлова З.А. Критерии оценки степени тяжести инфекционного мононуклеоза у детей // Детские инфекции. 2019. Т. 18, № 1. С. 56–59. [Popova O.A., Khokhlova Z.A. Criteria for assessing the severity of infectious mononucleosis in children. *Detskie infektsii = Children Infections, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 56–59. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2019-18-1-56-59*
14. Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1057–1066. [Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Kulova E.A. Methodological basics for differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1057–1066. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MBF-1661*
15. Попкова М.И., Уткин О.В. Генетическое разнообразие вируса Эпштейна–Барр: современный взгляд на проблему // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 1. С. 93–108. Popkova M.I., Utkin O.V. Genetic diversity of the Epstein–Barr virus: a modern view of the problem. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2022, vol. 99, no. 1, pp. 93–108. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-228*
16. Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Филатова Е.Н., Кулова Е.А. Методические подходы к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в слюне // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 461–474. [Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Filatova E.N., Kulova E.A. Methodological approaches to differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B in saliva. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 461–474. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1807*
17. Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Дидук С.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Структурно-функциональная характеристика онкогена LMP1 у больных с опухолями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34, № 2. С. 71–75. [Senyuta N.B., Smirnova K.V., Diduk S.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Gurtsevitch V.E. Structural and functional characteristics of the LMP1 oncogene in patients with tumors associated and not associated with the Epstein–Barr virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2016, vol. 31, no. 2, pp. 87–93. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-71-75*
18. Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э. Молекулярно-биологические свойства гена lmp1 вируса Эпштейна–Барр: структура, функции и полиморфизм // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 3. С. 5–13. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Senyuta N.B., Gurtsevitch V.E. Molecular biological properties of the Epstein–Barr virus LMP1 gene: structure, function and polymorphism. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 5–13. (In Russ.)*]
19. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 5. С. 239–247. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Deseases, 2017, vol. 22, no. 5, pp. 239–247. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247*
20. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65, № 2. С. 77–86. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86*

21. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Тутельян А.В., Боброва М.В. Эпидемиологические особенности инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98, № 6. С. 685–696. [Solomay T.V., Semenenko T.A., Tutelyan A.V., Bobrova M.V. Epidemiological characteristics of Epstein–Barr virus infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2021, vol. 98, no. 6, pp. 685–696. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-139*
22. Тимченко В.Н., Баннова С.Л., Павлова Н.В., Павлова Е.Б., Каплина Т.А., Федорова А.В., Булина О.В., Балашов А.Л., Хакизимана Ж.-К. ВЭБ-мононуклеоз на госпитальном этапе: клиническая характеристика и этиотропная терапия у детей различного возраста // Педиатр. 2018. Т. 9, № 6. С. 77–82. [Timchenko V.N., Bannova S.L., Pavlova N.V., Pavlova E.B., Kaplina T.A., Fedorova A.V., Bulina O.V., Balashov A.L., Hakizimana J.-C. EBV-mononucleosis in children at the hospital stage in modern conditions. *Pediatr = Pediatrician, 2018, vol. 9, no. 6, pp. 77–82. (In Russ.)*]
23. Хакизимана Ж.К., Тимченко В.Н., Шакмаева М.А., Каплина Т.А., Субботина М.Д., Баннова С.Л., Федорова А.В., Суховецкая В.Ф., Павлова Е.Б., Павлов Н.В. ВЭБ-мононуклеоз у детей в современных условиях // Детские инфекции. 2020. Т. 19, № 2. С. 23–28. [Hakizimana J.K., Timchenko V.N., Shakmaeva M.A., Kaplina T.A., Subbotina M.D., Bannova S.L., Fedorova A.V., Sukhovetskaya V.F., Pavlova E.B., Pavlova N.V. EBV mononucleosis in children in modern conditions. *Detskie infektsii = Children's Infections, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 23–28. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2020-19-2-23-28*
24. Яковлева Л.С., Сенюта Н.Б., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Варианты онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в клеточных линиях различного происхождения // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 5. С. 800–810. [Yakovleva L.S., Senyuta N.B., Goncharova E.V., Scherback L.N., Smirnova R.V., Pavlish O.A., Gurtsevitch V.E. Epstein–Barr Virus LMP1 oncogene variants in cell lines of different origin. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology, 2015, vol. 49, no. 5, pp. 800–810. (In Russ.)*] *doi: 10.7868/S0026898415050213*
25. Ai J.H., Xie Z.D., Liu C.Y., Gao L.W., Yan J. [Characteristic of nuclear antigen 1 gene and latent membrane protein 1 gene of Epstein–Barr virus in primary EBV infection in children in Beijing area in 2005–2010]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2012, vol. 26, no. 5, pp. 352–355. (In Chin.)*
26. Banko A.V., Lazarevic I.B., Stevanovic G., Cirkovic A., Karalic D., Cupic M., Banko B., Milovanovic J., Jovanovic T. Analysis of the variability of Epstein–Barr virus genes in infectious mononucleosis: investigation of the potential correlation with biochemical parameters of hepatic involvement. *J. Med. Biochem., 2016, vol. 35, no. 3, pp. 337–346. doi: 10.1515/jomb-2015-0021*
27. Becue-Bertaut M., Pages J. Multiple factor analysis and clustering of a mixture of quantitative, categorical and frequency data. *Computational Statistice and Data Analysis, 2008, vol. 52, pp. 3255–3268. doi: 10.1016/j.csda.2007.09.023*
28. Begić V., Korać P., Gašparov S., Rozman M., Simicic P., Zidovec-Lepej S. Molecular characterisation of Epstein–Barr virus in classical Hodgkin lymphoma. *Int. J. Mol. Sci., 2022, vol. 23, no. 24: 15635. doi: 10.3390/ijms232415635*
29. Cai K., Zhou B., Huang H., Tao R., Sun J., Yan C., Lee P.M.Y., Svendsen K., Fu B., Li J., Huang L. Risk of malignancy following exposure to Epstein-Barr Virus associated infectious mononucleosis: a nationwide population-based cohort study. *Front. Oncol., 2022, vol. 12: 991069. doi: 10.3389/fonc.2022.991069*
30. Coleman C.B., Daud I.I., Ogolla S.O., Ritchie J.A., Smith N.A., Sumba P.O., Dent A.E., Rochford R. Epstein–Barr virus type 2 infects T cells in healthy kenyan children. *J. Infect. Dis., 2017, vol. 216, no. 6, pp. 670–677. doi: 10.1093/infdis/jix363*
31. Coleman C.B., Lang J., Sweet L.A., Smith N.A., Freed B.M., Pan Z., Haverkos B., Pelanda R., Rochford R. Epstein–Barr virus type 2 infects T cells and induces B cell lymphomagenesis in humanized mice. *J. Virol., 2018, vol. 92, no. 21: e00813-18. doi: 10.1128/JVI.00813-18*
32. Correia S., Palser A., Elgueta Karstegl C., Middeldorp J.M., Ramayanti O., Cohen J.I., Hildesheim A., Fellner M.D., Wiels J., White R.E., Kellam P., Farrell P.J. Natural variation of Epstein–Barr virus genes, proteins, and primary microRNA. *J. Virol., 2017, vol. 91, no. 15: e00375-17. doi: 10.1128/JVI.00375-17*
33. Dambaugh T., Hennessy K., Chamnankit L., Kieff E. U2 region of Epstein–Barr virus DNA may encode Epstein–Barr nuclear antigen 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1984, vol. 81, pp. 7632–7636. doi: 10.1073/pnas.81.23.7632*
34. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology, 1999, vol. 261, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855*
35. Fafi-Kremer S., Morand P., Germi R., Ballout M., Brion J.P., Genoulaz O., Nicod S., Stahl J.P., Ruigrok R.W., Seigneurin J.M. A prospective follow-up of Epstein–Barr virus LMP1 genotypes in saliva and blood during infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis., 2005, vol. 192, no. 12, pp. 2108–2111. doi: 10.1086/498215*
36. Farrell P.J., White R.E. Do Epstein–Barr virus mutations and natural genome sequence variations contribute to disease? *Biomolecules, 2022, vol. 12, no. 1: 17. doi: 10.3390/biom12010017*
37. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein–Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One, 2017, vol. 12, no. 3: e0174221. doi: 10.1371/journal.pone.0174221*
38. Gatherer D., Depledge D.P., Hartley C.A., Szpara M.L., Vaz P.K., Benkő M., Brandt C.R., Bryant N.A., Dastjerdi A., Doszpoly A., Gompels U.A., Inoue N., Jarosinski K.W., Kaul R., Lacoste V., Norberg P., Origgi F.C., Orton R.J., Pellett P.E., Schmid D.S., Spatz S.J., Stewart J.P., Trimpert J., Waltzek T.B., Davison A.J. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae. *J. Gen. Virol., 2021, vol. 102, no. 10: 001673. doi: 10.1099/jgv.0.001673*
39. Hu L.-F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.-L., Ernberg I., Klein G. Winberg G. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol., 1991, vol. 72, pt 1, pp. 2399–2409. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2399*
40. Kwok H., Chan K.W., Chan K.H., Chiang A.K. Distribution, persistence and interchange of Epstein–Barr virus strains among PBMC, plasma and saliva of primary infection subjects. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 3: e0120710. doi: 10.1371/journal.pone.0120710*
41. Lorenzetti M.A., Gantuz M., Altcheh J., De Matteo E., Chabay P.A., Preciado M.V. Distinctive Epstein–Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: LMP1 sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol., 2012, vol. 50, no. 3, pp. 609–618. doi: 10.1128/JCM.05778-11*

42. Monteiro T.A.F, Costa I.B., Costa I.B., Corr a T.L.D.S., Coelho B.M.R., Silva A.E.S. Ramos F.L.P., Filho A.J.M., Monteiro J.L.F., Siqueira J.A.M., Gabbay Y.B., Sousa R.C.M. Genotypes of Epstein–Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belém, Brazil, between 2005 and 2016. *Braz. J. Infect. Dis., 2020, vol. 24, no. 4, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.bjid.2020.06.004*
43. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein–Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol., 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5222–5237. doi: 10.1128/JVI.03614-14*
44. Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol., 1987, vol. 61, no. 5, pp. 1310–1317. doi: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987*
45. Roderburg C., Krieg S., Krieg A., Luedde T., Kostev K., Loosen S.H. The Association between infectious mononucleosis and cancer: a cohort study of 24,190 outpatients in Germany. *Cancers (Basel), 2022, vol. 14, no. 23: 5837. doi: 10.3390/cancers14235837*
46. Sarshari B., Mohebbi S.R., Ravanshad M., Shahrokh S., Asadzadeh Aghdaei H. Sequence variations of Epstein–Barr virus LMP1 gene in gastric cancer and chronic gastritis isolates from Iranian patients. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench., 2022, vol. 15, no. 3, pp. 225–231. doi: 10.22037/ghfbb.v15i3.2578*
47. Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., AlMarawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein–Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One, 2017, vol. 12, no. 12: e0189033. doi: 10.1371/journal.pone.0189033*
48. Smith N.A., Coleman C.B., Gewurz B.E., Rochford R. CD21 (Complement Receptor 2) is the receptor for Epstein–Barr virus entry into T cells. *J. Virol., 2020, vol. 94, no. 11: e00428-20. doi: 10.1128/JVI.00428-20*

Авторы:

Попкова М.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Брызгалова Д.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Сахарнов Н.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Соболева Е.А., врач-инфекционист ГБУЗ НО Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия;
Назарова Л.В., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики, зав. клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ НО Инфекционная клиническая больница № 23 г. Нижнего Новгорода, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Popkova M.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Bryzgalova D.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Sakharnov N.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Soboleva E.A., Infectologist, Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Nazarova L.V., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, Infectious Clinical Hospital No. 23, Nizhniy Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.01.2023
Отправлена на доработку 26.03.2023
Принята к печати 27.03.2023

Received 16.01.2023
Revision received 26.03.2023
Accepted 27.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 497–505

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 497–505

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОТДЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА С АКТИВНОСТЬЮ СИСТЕМЫ «ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЯ — АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА» У НОВОРОЖДЕННЫХ С COVID-19

Л.В. Рычкова, М.А. Даренская, А.Г. Петрова, Н.В. Семенова, Е.В. Москалева, С.И. Колесников, А.С. Ваняркина, Л.И. Колесникова

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

Резюме. Коронавирусная инфекция, обусловленная вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), до сих пор считается нерешенной проблемой здравоохранения. Беременные женщины и новорожденные особенно уязвимы к инфекции COVID-19 по сравнению с детьми более старшего возраста и здоровыми молодыми людьми. В настоящее время практически отсутствуют данные о взаимосвязях различных звеньев иммунитета у пациентов в неонатальном периоде с коронавирусной инфекцией. Полученные в результате исследования данные могут способствовать лучшему пониманию патогенетических механизмов реактивности иммунных процессов у пациентов раннего возраста и формированию соответствующих подходов к профилактике и коррекции указанных нарушений. Целью настоящего исследования было определение интенсивности изменений некоторых показателей системы иммунитета и изучение их взаимосвязи с параметрами системы липопероксидации у новорожденных с COVID-19. Обследованы 2 группы новорожденных детей (средний возраст — 4±3,1 дня): с положительным (пациенты с COVID-19, n = 44) и отрицательным (контрольная группа, n = 80) результатами ПЦР назофарингеального мазка. Всем новорожденным проводили оценку отдельных показателей иммунного статуса и активности системы липопероксидации в периферической крови. Концентрацию Th1-провоспалительных цитокинов и Th2-противоспалительных интерлейкинов оценивали иммуноферментным методом, используя панели моноклональных антител. Для оценки системы липопероксидации использовались спектрофотометрические, флюорометрические и иммуноферментные методы анализа. Согласно нашим данным, у новорожденных с COVID-19 отмечалось снижение значений С-реактивного белка, провоспалительных цитокинов — TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 — и противоспалительного фактора (IL-4) в сравнении со здоровыми новорожденными. Изменения в системе липопероксидации в группе детей с COVID-19 касались более высоких значений диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ), конечных продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), повышенной активности супероксиддисмутазы (СОД) и сниженной активности глутатионпероксидазы (ГПО). Отмечены многочисленные межсистемные зависимости в группе новорожденных с COVID-19 (СРБ — Общая антиокислительная активность (АОА), IL-4 — КД и СТ, IL-4 — ТБК-АП, IL-4 — Общая АОА, IL-4 — СОД, IL-8 — СОД, IFNγ — GSH). Можно

Адрес для переписки:
Даренская Марина Александровна
664003, Россия, г. Иркутск ул. Тимирязева, 16, ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека.
Тел.: 8 964 227-52-72 (моб.).
E-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Contacts:
Marina A. Darenskaya
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryaseva str., 16, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems.
Phone: +7 964 227-52-72 (mobile).
E-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Для цитирования:
Рычкова Л.В., Даренская М.А., Петрова А.Г., Семенова Н.В., Москалева Е.В., Колесников С.И., Ваняркина А.С., Колесникова Л.И. Взаимосвязь отдельных показателей иммунного статуса с активностью системы «липопероксидация — антиоксидантная защита» у новорожденных с COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 497–505. doi: 10.15789/2220-7619-ARB-8057

Citation:
Rychkova L.V., Darenskaya M.A., Petrova A.G., Semenova N.V., Moskaleva E.V., Kolesnikov S.I., Vanyarkina A.S., Kolesnikova L.I. A relation between specific immune status indicators and activity of "lipid peroxidation — antioxidant defense" system in COVID-19 neonates // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 497–505. doi: 10.15789/2220-7619-ARB-8057

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ARB-8057

заключить, что у новорожденных с COVID-19 изменения в системе иммунитета носят неспецифический характер и сопровождаются повышенной интенсивностью реакций липопероксидации на фоне сниженных значений про- и противовоспалительных цитокинов. Данные результаты могут способствовать более точной оценке интенсивности и динамики развития коронавирусной инфекции у новорожденных, что должно являться важной составляющей профилактики дальнейших осложнений.

Ключевые слова: *COVID-19, вирусная нагрузка, интерлейкины, воспаление, окислительный стресс, новорожденные, дети.*

A RELATION BETWEEN SPECIFIC IMMUNE STATUS INDICATORS AND ACTIVITY OF "LIPID PEROXIDATION — ANTIOXIDANT DEFENSE" SYSTEM IN COVID-19 NEONATES

Rychkova L.V., Darenskaya M.A., Petrova A.G., Semenova N.V., Moskaleva E.V., Kolesnikov S.I., Vanyarkina A.S., Kolesnikova L.I.

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The 2019 coronavirus infection (COVID-19) has not been considered as a solved issue for public health. Pregnant women and newborns are specifically vulnerable to COVID-19 infection compared to older children and healthy young adults. Virtually no data on relation between diverse arms of immunity in patients in neonatal period and coronavirus infection are available. The obtained results can contribute to a better understanding of the pathogenetic mechanisms on reactivity of immune processes in young patients and corresponding formation of approaches for prevention and correction of such disorders. The aim of the study was to determine magnitude of specific altered parameters in immune system and their relation with lipid peroxidation parameters in COVID-19 newborns. Two groups of newborns (mean age 4±3.1 days) were examined: SARS-CoV-2-positive (COVID-19 patients, n = 44) and negative (control group, n = 80) PCR test of nasopharyngeal swab. All newborns were assessed for specific indicators of peripheral blood immune status and lipid peroxidation activity. The concentration of Th1-pro-inflammatory cytokines and Th2-anti-inflammatory interleukins was assessed by enzyme immunoassay method (a panel of monoclonal antibodies). Spectrophotometric, fluorometric and enzyme immunoassay methods to evaluate the lipid peroxidation system were used. According to our data, newborns with COVID-19 vs. healthy newborns had decreased CRP, pro-inflammatory cytokines — TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, and anti-inflammatory factor (IL-4). Change in lipid peroxidation system in children with COVID-was 19 related to higher level of DC, KD and CT, TBARs, increased SOD activity and reduced GPO. Numerous intersystem dependencies in the group of newborns with COVID-19 (CRP — Total AOA, IL-4 — KD and CT, IL-4 — TBARs, IL-4 — Total AOA, IL-4 — SOD, IL-8 — SOD, IFNγ — GSH) were noted. It can be concluded that in newborns with COVID-19, changes in the immune system are nonspecific and are accompanied by an increased intensity of lipid peroxidation reactions against the background of reduced values of pro- and anti-inflammatory cytokines. These results may contribute to a more accurate assessment of intensity and dynamics of emerging neonatal coronavirus infection, which should be an important arm in preventing subsequent complications.

Key words: *COVID-19, viral load, interleukins, inflammation, oxidative stress, newborns, children.*

Введение

Коронавирусная инфекция, обусловленная вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), до сих пор считается нерешенной проблемой здравоохранения. В начале своего распространения в мире COVID-19 характеризовалась высокой заболеваемостью, многочисленными серьезными экономическими и социальными последствиями [20, 27]. В настоящее время наблюдается существенный спад заболеваемости. Однако до сих пор остаются неизвестными многие патогенетические аспекты развития заболевания, в частности, неоднородность иммунологической реакции пациентов: от полностью бессимптомных до тяжелых, зачастую летальных, форм [17, 20, 22, 28]. На протяжении всего периода пандемии удельный вес детей среди заболевших оставался низким, также отмечалось более легкое течение и крайне редкое развитие осложнений и неблагоприятных исходов [5, 6, 7]. Наряду с этим, было отмечено, что беременные женщины и новорожденные особенно уязвимы к инфекции COVID-19 по сравнению с детьми более старшего возраста и здоровыми молодыми людьми [11]. Среди основных симптомов у пациентов в неонатальном периоде выделяют нарушения со стороны респираторного тракта (в 73% случаев) и лихорадку (в 63% случаев), летальные исходы, как правило, связаны с недоношенностью новорожденных [26].

Считается, что с вирусом SARS-CoV-2 организм человека ранее систематически не сталкивался. Это может быть одной из причин нестандартного ответа организма, включая врожденный и адаптивный клеточный иммунный ответ и некоторые другие его проявления [13]. Важной особенностью инфицирования вирусом SARS-CoV-2 считается активная вовлеченность системы иммунитета, которая, с одной стороны, уча-

ствует в элиминации вируса, а с другой — способствует развитию тяжелых нарушений со стороны разных органов и систем [20, 22].

Вирус также служит мощным активатором коморбидной патологии, основным патогенетическим фактором которой могут выступать нарушения продукции активных форм кислорода (АФК) и защиты от них [16, 23]. АФК как высокореакционные молекулы играют ведущую роль в реализации различных свободнорадикальных процессов в клетках, в том числе участвующих в функционировании иммунной системы [24, 29]. АФК обеспечивают антимикробный иммунитет, стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов, обеспечивают противовирусный иммунный ответ и т. д. [12]. В условиях же их резкого роста происходит повреждение первичных клеточных компонентов, включая липиды, белки, ДНК, и стимулирование воспалительных реакций [4, 32].

Несмотря на проводимые исследования, в настоящее время практически отсутствуют данные о взаимосвязях различных звеньев иммунитета и системы «липопероксидация–антиоксидантная защита» (ЛПО–АОЗ) у пациентов в неонатальном периоде с коронавирусной инфекцией. Полученные в результате исследования результаты могут способствовать лучшему пониманию патогенетических механизмов реактивности иммунных процессов у пациентов раннего возраста и формированию соответствующих подходов к профилактике и коррекции указанных нарушений.

На основании вышеизложенного, целью настоящего исследования было определение интенсивности изменений некоторых показателей системы иммунитета и изучение их взаимосвязи с параметрами системы ЛПО у новорожденных с COVID-19.

Материалы и методы

Обследованы 2 группы новорожденных детей (средний возраст — 4±3,1 дня): с положительным (пациенты с COVID-19) и отрицательным (контрольная группа) результатами полимеразной цепной реакции (ПЦР) назофарингеального мазка. У всех детей выполнен анализ назофаренгиальной вирусной нагрузки SARS-CoV-2. У детей с COVID-19 дополнительно определена степень тяжести заболевания и выявлены объективные признаки поражения легких в соответствии с данными компьютерной томографии (КТ) грудной клетки или рентгенографии (Rg) легких. Новорожденные отобраны из числа детей, госпитализированных в ОГАУЗ «Городская Ивано-Матренинская Детская Клиническая Больница» в период с 2020–2021 гг. с подтвержденным диагнозом COVID-19.

Контрольная группа включала здоровых новорожденных (n = 80) и была сопоставима по гестационному возрасту, антропометрическим данным и полу с группой больных детей. Набор контрольной группы осуществлялся в Иркутском городском перинатальном центре.

Критериями включения в группу с COVID-19 являлись: дети, рожденные живыми на сроке гестации более 36 недель; подтвержденный диагноз «COVID-19»; подписанное информированное согласие со стороны родителей или законных представителей ребенка.

Критерии включения в группу контроля: дети, рожденные живыми на сроке гестации более 36 недель; отсутствие диагноза «COVID-19» у ребенка; подписанное информированное согласие со стороны родителей или законных представителей ребенка.

Критерии исключения: нежелание родителей или опекунов пациента принимать участие в исследовании на любом из этапов, несоответствие пациента критериям включения.

Новорожденные с COVID-19 имели следующие характеристики: мальчики (n = 29; 66%)/девочки (n = 15; 34%); средний возраст в день госпитализации — 4±3,1 дня; масса тела при рождении — 3210 (2720; 3600) г; длина тела при рождении — 51 (49,5; 54) см; масса тела при поступлении в стационар — 3300 (2780; 3660) г; доношенные (n = 39)/недоношенные (n = 5); сразу были приложены к груди и период лечения в стационаре находились на грудном вскармливании (ГВ)/не находились на ГВ (n = 29; 66%/n = 15; 34%).

В период стационарного лечения состояние 19 (43%) новорожденных оценивалось как легкое, 17 (39%) — средней степени тяжести, у 8 (18%) было тяжелым. КТ- или Rg-признаки поражения легочной ткани (уплотнения по типу «матового стекла», симптом «булыжной мостовой», симптом «обратного ореола») обнаруживались у 24 (54%) новорожденных. Наиболее частыми клиническими проявлениями COVID-19 являлись повышение температуры тела (n = 15; 34%) и насморк (n = 13; 29%). У обследованных не было зафиксировано случаев респираторного дистресс-синдрома, мультисистемного воспалительного синдрома и летальных исходов.

Кровь для исследования брали из периферической вены (тыл кисти) в начальный период заболевания (дети с COVID-19) или на 3 сутки жизни (контрольная группа) в утренние часы перед кормлением. Использовались одноразовые вакуумные системы с иглой 23G. Всем детям проводилась анальгезия (нефармакологические методы коррекции боли — ненутритивное сосание 20% раствора глюкозы). В качестве материала исследования использовали плазму, сыворотку и гемолизат эритроцитов.

Всем новорожденным проводили комплексное иммунологическое обследование с оценкой иммунного статуса периферической крови. Концентрацию Th1-провоспалительных цитокинов TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 и Th2-противовоспалительных интерлейкинов IL-4, IFNγ оценивали иммуноферментным методом, используя панели моноклональных антител (АО «Вектор-Бест», Россия). Измерения проводили на микропланшетном фотометре (Multiskan EX, Финляндия).

Анализ активности неспецифической системы липопероксидации проводили по содержанию первичных продуктов — диеновых конъюгатов (ДК) и вторичных соединений — кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) в плазме крови по методу И.А. Волчегорского (1989) [2]. Содержание конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), определяли флуориметрически в плазме крови по методу В.Б. Гаврилова с соавт. (1987) [3]. О состоянии системы антиоксидантной защиты (АОЗ) судили по общей антиокислительной активности (АОА) (с помощью коммерческого набора фирмы «Randox» (Великобритания), активности супероксиддисмутазы (СОД) [30] в сыворотке крови, глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах (гемолизате) (с помощью коммерческого набора фирмы «Randox» (Великобритания)), восстановленного и окисленного глутатионов (GSH и GSSG) в эритроцитах (гемолизате) (метод P.J. Hisin, R. Hilf, 1976) [25]. Измерения производили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), спектрофлюорофотометре BTS-350 (Испания) и флюорате 02 АБФФ-Т (Россия). Иммуноферментный анализ осуществляли на микропланшетном ридере MultiSkan ELX808 (Biotek, США).

Проводили определение вирусной нагрузки (концентрации геном-эквивалентов вируса SARS-CoV-2 в 1 мл назофарингеальной жидкости).

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с использованием программы Statistica 10.0 (Statsoft Inc., R США). Использовали визуально-графический метод и критерии согласия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро–Уилка для определения близости к нормальному распределению данных; критерий Фишера для оценки равенства генеральных дисперсий; критерий Манна–Уитни для анализа межгрупповых различий. Корреляционный анализ выполнен по методике ранговой корреляции по Спирмену. Данные представлены в виде медиан (Me), первой и третьей квартилей (Q1; Q3). За уровень статистической значимости уровень принимали $p < 0,05$.

Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Выписка из протокола заседания № 6.1 от 19.06.2020). Подписание информированного согласия со стороны родителей/опекунов являлось обязательной процедурой для участия в исследовании.

Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск).

Результаты

По результатам анализа полученных данных у новорожденных с COVID-19 было отмечено снижение значений СРБ ($p < 0,0001$), а также провоспалительных цитокинов — TNFα ($p = 0,024$), IL-1β ($p = 0,0037$), IL-6 ($p = 0,00008$), IL-8 ($p = 0,00002$), содержание противоспалительного фактора (IL-4) также снижалось ($p < 0,0001$) в сравнении со здоровыми новорожденными (табл. 1).

Изменения в неспецифической системе ЛПО–АОЗ в группе детей с COVID-19 касались более высоких значений ДК ($p = 0,00004$), КД и СТ ($p = 0,00001$), ТБК-АП ($p < 0,0001$), повышенной ферментативной активности СОД ($p < 0,0001$) и сниженной активности ГПО ($p < 0,0001$) (табл. 2).

Далее был проведен корреляционный анализ исследуемых параметров, который показал наличие многочисленных межсистемных зависимостей в группе новорожденных с COVID-19: СРБ — Общая АОА ($r = -0,26$; $p = 0,027$), IL-4 — КД и СТ ($r = 0,42$; $p = 0,005$), IL-4 — ТБК-АП ($r = 0,37$; $p = 0,014$), IL-4 — Общая АОА ($r = 0,40$; $p = 0,007$), IL-4 — СОД ($r = -0,41$; $p = 0,005$), IL-8 — СОД ($r = 0,39$; $p = 0,009$), IFNγ — GSH ($r = -0,35$; $p = 0,018$). В группе контроля, для сравнения, была зарегистрирована единственная межсистемная взаимосвязь между TNFα и GSH ($r = -0,26$; $p = 0,027$).

Обсуждение

Согласно полученным данным, изменения в специфическом звене иммунитета у новорожденных с COVID-19 в сравнении с контрольными значениями сопровождались общим снижением всех показателей — как про-, так и противовоспалительного характера. Первая неделя жизни новорожденного является периодом радикальной функциональной перестройки всех систем органов, результатом чего является адаптация организма к внеутробным условиям жизни [1]. Система иммунитета в ходе данной адаптации претерпевает значительные изменения, когда имеет место формирование адекватного ответного механизма, обеспечивающего нормальное развитие малыша в дальнейшем [15]. Активно вовлеченными в процесс

Таблица 1. Анализ активности цитокинового статуса у новорожденных с COVID-19 (Me [Q_{25}; Q_{75}])
Table 1. Cytokine status activity in newborns with COVID-19 (Me [Q_{25}; Q_{75}])

Параметры Parameters	**Контрольная группа** Control **n = 80**	**Группа с COVID-19** Group with COVID-19 **n = 44**
СРБ, мг/л CRP, mg/L	8,6 [3,4; 15,6]	0,75 [0,3; 3,15] *
TNFα, пг/мл (pg/ml)	6,79 [3,55; 26,4]	3,2 [2,21; 4,00] *
IL-1β, пг/мл (pg/ml)	4,85 [2,55; 7,87]	1,15 [0,025; 2,87] *
IL-6, пг/мл (pg/ml)	30,8 [17; 118,8]	5,00 [0,5; 11,79] *
IL-8, пг/мл (pg/ml)	44,55 [17,62; 303,4]	15,07 [7,68; 23,21] *
IL-4, пг/мл (pg/ml)	3,8 [3,15; 4,7]	2,35 [1,06; 3,30] *
IFNγ, пг/мл (pg/ml)	10,85 [2,65; 26,4]	0,25 [0,00; 1,55] *

Примечание. * — статистически значимые различия между группами.
Note. * — significant inter-group differences.

адаптации новорожденного являются цитокины, белки малой массы, синтезируемые лейкоцитами, мононуклеарными фагоцитами и другими тканевыми клетками в пикомолярных и наномолярных концентрациях. Было показано, что у здорового ребенка к 3–7 дням жизни в плазме крови значительно повышаются уровни провоспалительных цитокинов, в частности IL-1β и TNFα, что можно объяснить активацией клеток моноцитарно-макрофагальной природы в ответ на воздействие большого количества экзогенных антигенов в раннем периоде адаптации. При этом системная воспалительная реакция у новорожденных не регистрируется, что, вероятно, связано с ростом IL-4 и TGF-β1 и запускаемых ими механизмов обратной связи [1]. Таким образом, ранний неонатальный период у здоровых доношенных детей характеризуется развитием лабораторных признаков системной воспалительной реакции. При этом дети с COVID-19 в нашем исследовании имели довольно низкие значения исследуемых параметров иммунитета относительно группы здоровых детей. Безусловно, детская популяция также подвержена инфицированию COVID-19, как и взрослая, однако физиологически является более неоднородной по причине особенностей иммунного реагирования [21]. Работ в данном направлении на настоящий момент крайне мало и они носят противоречивый характер.

Таблица 2. Анализ активности неспецифической системы липопероксидации-антиоксидантной защиты у новорожденных с COVID-19 (Me [Q_{25}; Q_{75}])
Table 2. Analysis of non-specific defense lipid peroxidation-antioxidant activity in newborns with COVID-19 (Me [Q_{25}; Q_{75}])

Параметры Parameters	**Контрольная группа** Control **n = 80**	**Группа с COVID-19** Group with COVID-19 **n = 44**
ДК, мкмоль/л CD, μmol/L	1,08 [0,66; 1,38]	1,45 [0,95; 2,58] *
КД и СТ, усл.ед. KD and CT, units	0,47 [0,36; 0,58]	0,65 [0,34; 1,46] *
ТБК-активные продукты, мкмоль/л TBA-active products, μmol/L	1,07 [0,71; 1,52]	1,89 [0,92; 2,75] *
Общая антиокислительная активность, усл.ед. Total antioxidant activity, units	1,52 [1,29; 1,75]	1,53 [0,97; 2,19]
Активность СОД, усл.ед. SOD activity, units	1,47 [1,39; 1,52]	1,84 [1,72; 1,9] *
Активность ГПО, усл.ед. GPO activity, units	1865 [1691; 1995]	1343 [1231; 1602,5] *
GSH, ммоль/л GSH, mmol/L	2,22 [1,94; 2,41]	2,29 [2,08; 2,52]
GSSG, ммоль/л GSSG, mmol/L	1,95 [1,62; 2,19]	1,96 [1,73; 2,35]

Примечание. * — статистически значимые различия между группами.
Note. * — significant inter-group differences.

Так, некоторые исследователи отмечают повышенный уровень СРБ у половины новорожденных (52%) и провоспалительного цитокина IL-6 в 22% случаев [11]. Имеются данные об отсутствии роста СРБ у детей в неонатальном периоде [19]. Вероятно, основной причиной снижения как про-, так и противовоспалительных цитокинов может быть незрелость некоторых звеньев врожденного иммунитета новорожденного. На фоне несформированного адаптивного иммунитета первостепенное значение для защиты будет принадлежать фагоцитам, способным быстро мигрировать к месту внедрения патогена, распознавать его и обезвреживать, а также нейтрофильным гранулоцитам и моноцитам, оказывающим иммунорегуляторное воздействие [7, 8]. Конституционально высокий уровень лимфоцитов, сдвиг их популяционного состава в сторону Th2 и смещение иммунологического ответа в сторону противовоспалительного обеспечивает активную противовирусную защиту без развития чрезмерно интенсивного каскада иммунологических реакций [8]. Вследствие этого новорожденные могут быть менее подвержены вирусным инфекциям.

Нами также было зарегистрировано наличие определенной вирусной нагрузки (ВН) у детей с COVID-19 ($3{,}2 \times 10^6$ ($5{,}7 \times 10^4$; $7{,}8 \times 10^7$) копий/мл) и эти значения были выше среднего показателя детской популяции в целом [10]. При этом корреляционных взаимосвязей назофарингиальной ВН с показателями иммунитета обнаружено не было, что может быть объяснено наличием вирусных частиц на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и отсутствием их во внутренних средах организма. Данный факт также может обосновывать более низкие показатели системы иммунитета у детей с COVID-19. На основании чего можно сделать предположение об элиминации вируса со слизистых оболочек до развития полноценного иммунного ответа.

Значения параметров неспецифической системы ЛПО–АОЗ в группе детей с COVID-19 показали иную картину, отличную от реактивности специфического звена системы иммунитета. Так, нами отмечен рост значений липоперекисных продуктов на всех этапах цепной реакции. Полученные результаты согласуются с данными по респираторным вирусным инфекциям, регистрируемым у детей неонатального периода [14]. Доказано, что с генерацией продуктов ЛПО, вызванной респираторными вирусами, связан целый каскад негативных патологических процессов [33]. Усиление генерации кислородных метаболитов, избыточное и неадекватное их выделение во внеклеточное пространство в нефизиологических концентрациях имеет отрицательную сторону, так как может обусловливать разрушение тканей и эндотелия сосудов как в очаге воспаления, так и дистантно [18]. При этом, высокая активность окислительных процессов наблюдается в условиях выраженной недостаточности внутриклеточных АОС, когда свободные радикалы не элиминируются. Согласно нашим данным, у детей с COVID-19 отмечалась повышенная активность фермента первичного звена защиты — СОД, на фоне сниженных значений ГПО. СОД является ключевым ферментом, обеспечивающим врожденный антиоксидантный ответ за счет обезвреживания активных форм кислорода на первичных этапах. ГПО участвует в процессах детоксикации гидроперекисей липидов и обеспечивает антиоксидантный эффект на второй линии защиты. В целом, у новорожденных обнаружены низкая активность антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, супероксидисмутазы и особенно каталазы) [33]. Однако присоединение коронавирусной инфекции может снижать ферментативную активность тиол-дисульфидной системы.

Интересным представляется анализ функциональных взаимосвязей уровня цитокинов про- и противовоспалительного характера и системы ЛПО у пациентов с COVID-19. Примечательными являются взаимосвязи провоспалительного медиатора — IL-4 с липоперекисными продуктами, а также компонентами АОЗ, что свидетельствует о взаимодействии указанных показателей в процессе нивелирования инфекционных агентов. Активное участие антиоксидантных факторов отмечалось также в отношении провоспалительных цитокинов — IL-8 и белка острой фазы — СРБ, что, вероятно, может определять противоспалительный эффект.

В целом накопленный за время борьбы с новой коронавирусной инфекцией клинический опыт позволяет говорить о более легком течении COVID-19 у новорожденных детей [5, 6, 9]. Есть разные предположения относительно данного факта, среди них — наличие у детей более активного врожденного иммунного ответа, более здоровых дыхательных путей, более «энергичного» иммунного ответа у взрослых [20, 22, 27]. Одновременное присутствие других вирусов в слизистой оболочке легких и дыхательных путей, которые часто встречаются у детей раннего возраста, может ограничить рост SARS-CoV-2 путем прямого вирус-вирусного взаимодействия и конкуренции [34]. Известно также, что дети менее подвержены воздействию новой коронавирусной инфекции по причине незрелости системы иммунитета [23]. Есть гипотеза о более высоком содержании sCD26 у новорожденных и маленьких детей, что может также служить защитой от COVID-19 [9]. Возможным объяснением может быть также нахождение

большинства новорожденных на грудном вскармливании с периода рождения, что обеспечивает выраженный провоспалительный и антиоксидантный эффект [31].

Заключение

Можно заключить, что у новорожденных с COVID-19 изменения в системе иммунитета носят неспецифический характер (сниженные значения про- и противовоспалительных цитокинов) и сопровождаются повышенной интенсивностью реакций ЛПО. Данные результаты могут способствовать более точной оценке интенсивности и динамики развития коронавирусной инфекции у новорожденных, что должно являться важной составляющей профилактики дальнейших осложнений.

Список литературы/References

1. Аманова Н., Исмаилова А. Значение про- и противовоспалительных цитокинов в физиологической адаптации новорожденных детей // Журнал гепато-гастроэнтерологических исследований. 2022. Т. 2, № 3. С. 37–40. [Amanova N., Ismailova A. The value of pro- and anti-inflammatory cytokines in the physiological adaptation of newborn children. *Zhurnal gepato-gastroenterologicheskikh issledovanii = Journal of Hepato-Gastroenterological Research, 2022, vol. 2, no. 3, pp. 37–40. (In Russ.)*]
2. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лившиц В.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии. 1989. Т. 35, № 1. С. 127–131. [Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Livshits V.I. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoi khimii = Medicinal Chemistry Issues, 1989, vol. 35, no. 1, pp. 127–131. (In Russ.)*]
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопросы медицинской химии. 1987. № 1. С. 118–122. [Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Mazhul L.M. Analysis of methods for determining the products of lipid peroxidation in blood serum by the test with thiobarbituric acid. *Voprosy meditsinskoi khimii = Medicinal Chemistry Issues, 1987, no. 1, pp. 118–122. (In Russ.)*]
4. Даренская М.А., Колесникова Л.И., Колесников С.И. Свободнорадикальные реакции при социально значимых инфекционных заболеваниях: ВИЧ-инфекции, гепатитах, туберкулезе // Вестник Российской академии медицинских наук. 2020. Т. 75, № 3. С. 196–203. [Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. Free radical reactions in socially significant infectious diseases: HIV infection, hepatitis, tuberculosis. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, 2020, vol. 75, no. 3, pp. 196–203. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/vramn1328*
5. Долгополов И.С., Рыков М.Ю. Коронавирусная инфекция COVID-19 у детей: обзор литературы // Российский педиатрический журнал. 2022. Т. 3, № 1. С. 32–39. [Dolgopolov I.S., Rykov M.Yu. Coronavirus infection COVID-19 in children: a review of the literature. *Rossiiskii pediatricheskii zhurnal = Russian Pediatric Journal, 2022, vol. 3, no. 1. pp. 32–39. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/rpj.v3i1.2415*
6. Жуковец И.В., Андриевская И.А., Кривощекова Н.А., Смирнова Н.А., Петрова К.К., Харченко М.В., Никачало Д.А. Первые последствия пандемии COVID-19: осложнения беременности, здоровье новорожденных и ожидаемые репродуктивные потери // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2022. № 84. С. 77–85. [Zhukovets I.V., Andrievskaya I.A., Krivoshchekova N.A., Smirnova N.A., Petrova K.K., Kharchenko M.V., Nikachalo D.A. The first consequences of the COVID-19 pandemic: pregnancy complications, newborn health and expected reproductive losses. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration, 2022, no. 84, pp. 77–85. (In Russ.)*] *doi: 10.36604/1998-5029-2022-84-77-85*
7. Иванова И.Е., Родионов В.А. Особенности новой коронавирусной инфекции COVID-19 у детей // Здравоохранение Чувашии. 2020. № 2. С. 50–59. [Ivanova I.E., Rodionov V.A. Features of the new coronavirus infection COVID-19 in children. *Zdravookhranenie Chuvashii = Public Health of Chuvashia, 2020, no. 2, pp. 50–59. (In Russ.)*] *doi: 10.25589/GIDUV.2020.32.81.011*
8. Никитина И.В., Донников А.Е., Крог-Йенсен О.А., Ленюшкина А.А., Дегтярева Н.Д., Дегтярева А.В. Роль ренин-ангиотензиновой системы, иммунологических и генетических факторов в реализации COVID-19 у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 4. С. 16–26. [Nikitina I.V., Donnikov A.E., O.A. Krogh-Jensen,, Lenyushkina A.A., Degtyareva N.D., Degtyareva A.V., The role of the renin-an-giotensin system, immunological and genetic factors in children with COVID-19. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 16–26. (In Russ.)*] *doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-4-16-26*
9. Новиков В.В., Караулов А.В. «Шторм» растворимых дифференцировочных молекул при COVID-19 // Иммунология. 2022. Т. 43, № 4. С. 458–467. [Novikov V.V., Karaulov A.V. "Storm" of soluble differentiation molecules in COVID-19. *Immunologiya = Immunologiya, 2022, vol. 43, no. 4, pp. 458–467. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0206-4952-2022-43-4-458-467*
10. Орлова Е.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Хромова П.А., Синьков В.В., Хаснатинов М.А., Рычкова Л.В., Колесникова Л.И. Вирусная нагрузка при COVID-19: недооцененный клинический и эпидемиологический маркер // Acta biomedica scientifica. 2021. Т. 6, № 1. С. 33–39. [Orlova E.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Khromova P.A., Sinkov V.V., Khasnatinov M.A., Rychkova L.V., Kolesnikova L.I. Viral load in COVID-19: an underestimated clinical and epidemiological marker. *Acta Biomedica Scientifica, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 33–39. (In Russ.)*] *doi: 10.29413/ABS.2021-6.1.5*
11. Павленко Ю.А. Течение COVID-19 у новорожденных // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14, № 3. С. 61–65. [Pavlenko Yu.A. The course of COVID-19 in newborns. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2022, vol. 14, no. 3, pp. 61–65. (In Russ.)*] *doi: 10.22625/2072-6732-2022-14-3-61-65*

12. 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'yova 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*
13. 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*
14. Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Абрамова И.В., Чаша Т.В., Парейшвили В.В. Оценка окислительного стресса в пуповинной крови и лизате эндотелиальных клеток сосудов пупочного канатика новорожденных // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 5. С. 274–277. [Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Abramova I.V., Chasha T.V., Pareishvili V.V. Evaluation of oxidative stress in cord blood and lysate of endothelial cells of vessels of the umbilical cord of newborns. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 274–277. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2017-5-274-277*
15. Румянцев А.Г. Роль взаимоотношений матери и плода в формировании иммунной системы новорожденного // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2019. Т. 98, № 3. С. 180–187. [Rumyantsev A.G. The role of the relationship between mother and fetus in the formation of the immune system of the newborn. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. The journal named after G.N. Speransky, 2019, vol. 98, no. 3, pp. 180–187. (In Russ.)]*
16. Рычкова Л.В., Даренская М.А., Семенова Н.В., Колесников С.И., Петрова А.Г., Никитина О.А., Бричагина А.С., Кудеярова Е.А., Колесникова Л.И. Состояние антиоксидантного статуса у детей и подростков с COVID-19 // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). 2021. Т. 6, № 6–2. С. 29–36. [Rychkova L.V., Darenskaya M.A., Semyonova N.V., Kolesnikov S.I., Petrova A.G., Nikitina O.A., Brichagina A.S., Kudeyarova E.A., Kolesnikova L. Antioxidant status in children and adolescents with COVID-19. *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal), 2021, vol. 6, no. 6–2, pp. 29–36. (In Russ.)] doi: 10.29413/ABS.2021-6.6-2.4*
17. Смирнов В.С., Тотолян Арег А. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 259–268. [Smirnov V.S., Totolian Areg A. Innate Immunity in Coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 259–268. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-III-1440*
18. Солодовникова О.Н., Молочный В.П. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей // Дальневосточный медицинский журнал. 2012. № 1. С. 118–122. [Solodovnikova O.N., Molochny V.P. "Oxygen explosion" of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of the inflammatory response in purulent infections in children. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal = Far Eastern Medical Journal, 2012, no. 1, pp. 118–122. (In Russ.)]*
19. Шакмаева М.А. Особенности новой коронавирусной инфекции у детей разного возраста // Детские инфекции. 2021. Т. 20, № 2. С. 5–9. [Shakmaeva M.A. Features of a new coronavirus infection in children of different ages. *Detskie infektsii = Children's Infection, 2021, vol. 20, no. 2, pp. 5–9. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-81 07-2021-20-2-5-9*
20. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В. COVID-19: этиология, клиника, лечение // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 421–445. [Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kruzhkova I.S., Maleev V.V. COVID-19: etiology, clinical picture, treatment. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 421–445. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CEC-1473*
21. Aydoğan S., Zenciroglu A., Çitli R., Dilli D., Özdem S. Evaluation of newborns diagnosed with COVID-19: a single-center experience. *Am. J. Perinatol., 2022. doi: 10.1055/s-0042-1753522*
22. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol., 2020, vol. 20, pp. 269–270. doi: 10.1038/s41577-020-0308-3*
23. Darenskaya M., Kolesnikova L., Kolesnikov S. The association of respiratory viruses with oxidative stress and antioxidants. Implications for the COVID-19 pandemic. *Cur. Pharm. Des., 2021, vol. 27, no. 13, pp. 1618–1627. doi: 10.2174/13816128276662 10222113351*
24. Delgado-Roche L., Mesta F. Oxidative stress as key player in severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection. *Arch. Med. Res., 2020, vol. 51, no. 5, pp. 384–387. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.04.019*
25. Hisin P.J., Hilf R. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem., 1976, no. 74, pp. 214–226. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2*
26. Karabay M., Çınar N., Suzan O.K., Çaka S.Y., Karabay O. Clinical characteristics of confirmed COVID-19 in newborns: a systematic review. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med., 2022, vol. 35, no. 22, pp. 4386–4397. doi: 10.1080/14767058.2020.1849124*
27. Lai C.C., Shih T.P., Ko W.C., Tang H.J., Hsueh P.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents, 2020, vol. 55, no. 3: 105924. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924*
28. Medeiros K.S. de, Sarmento A.C.A., Costa A.P.F., Macêdo L.T.A., da Silva L.A.S., de Freitas C.L., Simões A.C.Z., Gonçalves A.K. Consequences and implications of the coronavirus disease (COVID-19) on pregnancy and newborns: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Int. J. Gynaecol. Obstet., 2022, vol. 156, no. 3, pp. 394–405. doi: 10.1002/ijgo.14015*
29. Mehta M.M., Weinberg S.E., Chandel N.S. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nat. Rev. Immunol, 2017, no. 17, pp. 608–620. doi: 10.1038/nri.2017.66*
30. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem., 1972, no. 247, pp. 3170–3175. doi: 10.1016/S0021-9258(19)45228-9*
31. Quitadamo P.A., Comegna L., Cristalli P. Anti-infective, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties of breast milk factors for the protection of infants in the pandemic from COVID-19. *Front. Public Health, 2021, no. 8: 589736. doi: 10.3389/fpubh.2020.589736*

32. Sandhir R., Halder A., Sunkaria A. Mitochondria as a centrally positioned hub in the innate immune response. *Biochim. Biophys. Acta, 2017, no. 1863, pp. 1090–1097. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.10.020*
33. Shoji H., Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2007, no. 10, pp. 324–328. doi: 10.1097/MCO.0b013e3280a94f6d*
34. Wetzke M., Funken D., Lange M., Bejo L., Haid S., Monteiro J.G.T., Schütz K., Happle C., Schulz T.F., Seidenberg J., Pietschmann T., Hansen G. IRIS: infection with respiratory syncytial virus in infants — a prospective observational cohort study. *BMC Pulm. Med., 2022, no. 22: 88. doi: 10.1186/s12890-022-01842-1*

Авторы:
Рычкова Л.В., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Даренская М.А., д.б.н., профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Петрова А.Г., д.м.н., профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории инфектологии и иммунопрофилактики в педиатрии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Семенова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Москалева Е.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории инфектологии и иммунопрофилактики в педиатрии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Колесников С.И., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Ваняркина А.С., к.м.н., научный сотрудник лаборатории инфектологии и иммунопрофилактики в педиатрии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Колесникова Л.И., академик РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:
Rychkova L.V., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Director of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Darenskaya M.A., DSc (Biology), Professor of the RAS, Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Petrova A.G., DSc (Medicine), Professor of the RAS, Leading Researcher, Laboratory of Infectology and Immunoprophylaxis in Pediatrics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Semenova N.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Moskaleva E.V., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Infectology and Immunoprophylaxis in Pediatrics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Kolesnikov S.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Vanyarkina A.S.,PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Infectology and Immunoprophylaxis in Pediatrics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Kolesnikova L.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Scientific Director, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.03.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 25.03.2023
Accepted 21.06.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 506–516

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 506–516

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ НОСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО РИНИТА

О.В. Смирнова, Н.С. Гончарова

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Резюме. Дисбиоз слизистой оболочки полости носа способствует развитию вторичных иммунных расстройств, дезадаптации и содействует развитию патологических процессов вне зависимости от фенотипа хронического ринита. Целью нашей работы явилось сравнительное изучение видового и количественного состава микробной флоры и частоты ее встречаемости у пациентов с различными формами хронического ринита. В работе приведены результаты лабораторного обследования больных с ХР (79 человек в возрасте от 18 до 70 лет), из них 20 пациентов с хроническим аллергическим, 20 — с хроническим вазомоторным, 18 — с хроническим атрофическим, 21 — с хроническим инфекционным ринитами. Контрольной группой служили 40 практически здоровых доноров. Всем пациентам было проведено бактериологическое исследование слизистой оболочки полости носа. Проводился статистический анализ полученных результатов с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008). Для оценки различий в группах использовались непараметрические критерии Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни и Уилкоксона. Критический уровень статистической значимости при проверки научных гипотез считался равным $p < 0,05$. В контрольной группе в микрофлоре слизистой оболочки полости носа выявляются микроорганизмы родов *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Acinetobacter, Klebsiella, Proteus*, которые не вызывают патологических изменений. Интересным фактом является выявление *Proteus mirabilis* и *Acinetobacter baumannii* у здоровых добровольцев при отсутствии у них клинических проявлений инфицирования, что доказывает возможность сосуществования с условно-патогенной флорой при сохранной функции иммунной системы. При ХАлР выявляются микроорганизмы родов *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Enterobacter, Corynebacterium*. При ХВР выявляются представители родов *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Klebsiella*, при хроническом атрофическом рините — представители родов *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Acinetobacter*, с преобладанием бактерий *Klebsiella*, при ХИР — представители родов *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Acinetobacter, Escherichia, Enterobacter, Corynebacterium, Pseudomonas, Proteus, Candida*. Обнаружено отсутствие и/или снижение количества представителей нормофлоры, с выявлением патогенных и условно-патогенных бактерий. При воспалении в слизистой оболочке полости носа, независимо от его этиологии, происходит изменение количественного и видового состава микрофлоры. Самый выраженный дисбиоз микрофлоры слизистой оболочки полости носа выявлен при ХИР.

Ключевые слова: *хронический ринит, фенотип, микрофлора, дисбиоз слизистой полости носа, бактериологическое исследование, патогенные бактерии.*

Адрес для переписки:
Смирнова Ольга Валентиновна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 913 567-97-19. E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Contacts:
Olga V. Smirnova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3g, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 913 567-97-19. E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Для цитирования:
Смирнова О.В., Гончарова Н.С. Сравнительная характеристика микрофлоры слизистой оболочки полости носа при различных формах хронического ринита // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 506–516. doi: 10.15789/2220-7619-CCO-8056

Citation:
Smirnova O.V., Goncharova N.S. Comparative characteristics of nasal mucosa microflora in various forms of chronic rhinitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 506–516. doi: 10.15789/2220-7619-CCO-8056

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CCO-8056

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF NASAL MUCOSA MICROFLORA IN VARIOUS FORMS OF CHRONIC RHINITIS

Smirnova O.V., Goncharova N.S.

Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Dysbiosis of the nasal mucosa contributes to the development of secondary immune disorders, maladjustment and contributes to the development of pathological processes, regardless of the phenotype of chronic rhinitis. The aim of our work was to comparatively assess microbial species and quantitative composition as well as frequency of its occurrence in patients with various forms of chronic rhinitis. We present the results of a laboratory examination of patients with chronic rhinitis (79 subjects aged 18 to 70 years), including 20 patients with chronic allergic, 20 with chronic vasomotor, 18 with chronic atrophic, 21 with chronic infectious rhinitis. The control group consisted of 40 apparently healthy donors. All patients underwent nasal mucosa bacteriological examination. Statistical analysis of the obtained results was carried out using the Statistica for Windows 8.0 software package (StatSoft Inc., USA, 2008). Nonparametric Kruskal–Wallis, Mann–Whitney, and Wilcoxon tests were used to assess differences in groups. The critical level of statistical significance in testing scientific hypotheses was considered equal to $p < 0.05$. In the control group, microorganisms of the genera *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Acinetobacter, Klebsiella, Proteus* are detected in the microflora of the nasal mucosa, which do not cause pathological changes. An interesting fact is the detection of *Proteus mirabilis* and *Acinetobacter baumannii* in healthy volunteers in the absence of clinical manifestations of infection, which proves the possibility of coexistence with opportunistic flora while maintaining the immune system functionining. In chronic allergic rhinitis, microorganisms of the genera *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Enterobacter, Corynebacterium* are detected. In chronic vasomotor rhinitis, representatives of the genera *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Klebsiella* are detected. In chronic atrophic rhinitis, representatives of the genera *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Acinetobacter* are detected, with a predominance of *Klebsiella* bacteria. In chronic infectious rhinitis, representatives of the genera *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Acinetobacter, Escherichia, Enterobacter, Corynebacterium, Pseudomonas, Proteus, Candida* are detected. The absence and/or decrease in the number of representatives of the normoflora was found identifying pathogenic and opportunistic bacteria. With inflammation in the mucous membrane of the nasal cavity, regardless of its etiology, there is a change in the microflora quantitative and species composition. The most pronounced dysbiosis of the nasal mucosa microflora was found in chronic infectious rhinitis.

Key words: *chronic rhinitis, phenotype, microflora, dysbiosis of the nasal mucosa, bacteriological examination, pathogenic bacteria.*

Введение

В течение последних десяти лет отмечен рост заболеваемости хроническим ринитом (ХР), обусловленный ухудшающимися экологическими условиями, увеличением респираторных аллергенов и вирусных заболеваний, прогрессирующим снижением местного и общего иммунитета, поздней обращаемостью за медицинской помощью [2]. При всех формах ХР происходит снижение защитных свойств слизистой оболочки полости носа, что может сопровождаться присоединением бактериальной инфекции. Дисбиоз слизистой оболочки способствует развитию вторичных иммунных расстройств и дезадаптации, которая при дисбактериозе содействует развитию патологических процессов. Имеются данные, что разные фенотипические варианты ХР [вазомоторный (ХВР), аллергический (ХАлР), атрофический (ХАР) и инфекционный (ХИР)] характеризуются своим спектром микроорганизмов в носовой полости, который существенно влияет на течение заболевания. Учитывая, что ХР первично имеют сходную симптоматику, выявление индивидуального набора возбудителей позволит осуществить и оптимизировать своевременное, персонифицированное лечение и профилактику данных состояний [4, 5]. Все это свидетельствует об актуальности изучения микрофлоры слизистой оболочки носа при различных фенотипических вариантах ХР.

Целью нашей работы явилось сравнительное изучение видового и количественного состава микробной флоры и частоты ее встречаемости у пациентов с различными формами ХР.

Материалы и методы

В работе приведены результаты лабораторного обследования больных с ХР общей численностью 79 человек (42 мужчин и 37 женщин) в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст составил 43,5±0,9 лет), из них 20 пациентов с ХАлР (12 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 21 до 67 лет (средний возраст составил 45,1±1,9 лет), 20 пациентов с ХВР (11 мужчин и 9 женщин) в возрасте от 24 до 55 лет (средний возраст составил 35,1±1,9 лет), 18 больных ХАР (7 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 33 до 70 лет (средний возраст составил 50,3±2,9 лет), 21 пациент с ХИР (12 мужчин и 9 женщин) в возрас-

те от 20 до 67 лет (средний возраст составил 45,1±1,9 лет). Контрольной группой служили 40 практически здоровых доноров, не имеющих оториноларингологических жалоб и ринологического анамнеза, у которых отсутствовали изменения слизистой оболочки полости носа по результатам риноэндоскопии (23 мужчины и 17 женщин) в возрасте от 18 до 65 лет (средний возраст 43,8±1,3 лет). Исследуемые группы были сопоставимы по полу (p = 0,5) и возрасту (p = 0,6). Критериями включения в группы пациентов и контрольную группу были: возраст от 18 до 70 лет, информированное согласие на участие в исследовании. Критериями включения в основные группы являлись подтвержденные диагнозы: ХАлР, ХВР, ХАР, ХИР. Диагноз ХР верифицировался по клиническим данным, данным анамнеза и риноэндоскопии с использованием общепринятой классификации на основании клинических рекомендаций Министерства здравоохранения РФ. Диагностика ХР осуществлялась врачом-оториноларингологом при обращении пациента за лечением, с учетом полного комплекса инструментального обследования. Критериями исключения из вышеупомянутых групп явились: наличие тяжелых соматических заболеваний, в том числе — ВИЧ-инфекции, туберкулеза, наркотическая зависимость. Также в исследование не включались пациенты, отказавшиеся принять участие в данном научном исследовании. Исследование одобрено ЛЭК ФИЦ КНЦ СО РАН (протокол № 11 от 01.11.2020). Все этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, в исследовании соблюдались.

Всем пациентам было проведено бактериологическое исследование слизистой оболочки полости носа. Взятие материала для этого исследования производилось при передней риноскопии со слизистой средней носовой раковины полости носа стерильным микробиологическим тампоном. Микробиологический тампон помещали в стерильную транспортную среду Эймса (Италия) с активированным углем и в течение 2 ч доставляли в лабораторию. Посев с тампона на поверхность твердых питательных сред осуществлялся стандартным полуколичественным методом. Выделение микроорганизмов проводили на питательных средах: 5% кровяном агаре, стафилококк-агаре, агаре Эндо и Сабуро. Культивирование для стрептококка и гемофильной палочки проводилось при повышенной влажности среды в атмосфере, содержащей 5–10% CO_2. Посев проводили секторным методом. Засеянные среды инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 ч. При необходимости выросшие колонии пересевали на скошенный мясопептонный агар для получения чистых культур и изучения признаков, используемых при идентификации. О чистоте культуры судили с помощью визуального и микроскопического контроля. Идентификацию выделенных культур проводили с использованием наиболее рационального в каждом случае набора методов (классические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические методы, масс-спектрометрия MaldiToff). Рост микробов в 10^2 КОЕ/мл считали как скудный рост; в 10^3 КОЕ/мл — умеренный рост; в 10^5 и выше КОЕ/мл — массивный рост [8].

В соответствии с дизайном исследования первичное взятие материала проводилось до начала терапии. На первом этапе было проведено исследование микробиома слизистой оболочки полости носа; на втором этапе был изучен родовой и видовой состав полученных бактерий и грибов, проведена сравнительная характеристика микробного пейзажа слизистой оболочки носа у пациентов с ХР в зависимости от его этиологии; на третьем этапе проведена количественная оценка выделенных представителей микрофлоры.

Проводился статистический анализ полученных результатов с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel (Microsoft, США, 2007). Для оценки различий в группах использовались непараметрические критерии Краскела–Уоллиса (для трех и более групп сравнения), Манна–Уитни и Уилкоксона (для попарного сравнения). Критический уровень статистической значимости при проверки научных гипотез считался равным $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25}–Q_{75}) [10,11,12].

Результаты

Всего было произведено 119 бактериологических исследований состояния слизистой оболочки полости носа, из них 20 (16,8%) посевов выполнено пациентам с ХАлР, 20 (16,8%) посевов — пациентам с ХВР, 18 (15,1%) — пациентам с ХАР, 21 (17,7%) — пациентам с ХИР и 40 (33,6%) посевов пациентам из группы контроля, не имеющих патологии носа, оториноларингологических жалоб и ринологического анамнеза.

В ходе исследования (табл. 1) было выявлено наличие микрофлоры на слизистых полости носа у 67 (84,8%) исследуемых пациентов с ХР и у 32 (80%) добровольцев из группы контроля. Рост микрофлоры у 100% исследуемых выявлен в группе пациентов с ХИР. Рост микрофлоры отсутствовал у 20 (15,2%) обследованных из групп с ХР.

Таблица 1. Наличие микроорганизмов на слизистой оболочке полости носа у больных различными вариантами ХР

Table 1. Microbial composition on the mucous membrane of the nasal cavity in patients with various types of chronic rhinitis

Наличие микроорганизмов Presence of microorganisms	**Контрольная группа** Control group **n = 40 (1)**		**Больные ХАлР** Patients with CAIR **n = 20 (2)**		**Больные ХВР** Patients with CVR **n = 20 (3)**		**Больные ХАР** Patients with CAR **n = 18 (4)**		**Больные ХИР** Patients with CIR **n = 21 (5)**		**Уровень значимости отличий, p** p value
	абс. abs.	%	**абс.** abs.	%	**абс.** abs.	%	**абс.** abs.	%	**абс.** abs.	%	
Выявлена бактериальная или/и грибковая микрофлора Identified bacterial or/and fungal microflora	32	80	17	85	15	75	14	78	21	100	p = 0,083
Не выявлены бактериальные и грибковые агенты No bacterial and fungal agents detected	8	20	3	15	5	25	4	22	0	0	

Примечание. ХАлР — хронический аллергический ринит; ХВР — хронический вазомоторный ринит; ХАР — хронический атрофический ринит; ХИР — хронический инфекционный ринит. Частота встречаемости (в %) рассчитана для каждой в отдельности группы пациентов.

Note. CAIR — chronic allergic rhinitis; CVR — chronic vasomotor rhinitis; CAR — chronic atrophic rhinitis; CIR — chronic infectious rhinitis. The frequency of occurrence (in %) was calculated for each individual group of patients.

На следующем этапе исследования была определена морфология выделенных микроорганизмов (табл. 2). Кокковая флора выделена во всех группах исследования, наибольшее процентное содержание ее установлено в группе пациентов с ХИР, наименьшее — в группе пациентов с ХАР. Палочковидные бактерии выделены также во всех группах исследования, наибольшее их процентное количество определяется у пациентов из группы с ХАР, наименьшее — у пациентов из группы с ХВР. Грибковая флора выделена только у пациентов из группы с ХИР.

На следующем этапе в ходе исследования было выделено 11 родов и 22 вида микроорганизмов (табл. 3).

Во всех исследуемых группах выделены представители рода *Staphylococcus*, вид *Staphylococcus aureus* чаще встречается в группе с ХИР, не выявлялся у пациентов с ХВР; вид *Staphylococcus*

Таблица 2. Морфологические виды выделенных микроорганизмов со слизистой оболочки полости носа у больных различными вариантами ХР

Table 2. Morphological types of microorganisms isolated from the nasal cavity mucous membrane in patients with various types of chronic rhinitis

Морфология выделенного микроорганизма Morphology of the isolated microorganism	**Контрольная группа** Control group **n = 40 (1)**		**Больные ХАлР** Patients with CAIR **n = 20 (2)**		**Больные ХВР** Patients with CVR **n = 20 (3)**		**Больные ХАР** Patients with CAR **n = 18 (4)**		**Больные ХИР** Patients with CIR **n = 21 (5)**	
	абс. abs.	%	**абс.** abs.	%	**абс.** abs.	%	**абс.** abs.	%	**абс.** abs.	%
Кокковая флора Coccal flora	31	77,5	17	85	15	75	13	72	20	95
Палочковидные бактерии Rod-shaped bacteria	7	17,5	4	20	2	10	7	39 $p_1 < 0,001$	7	33 $p_1 < 0,001$
Грибковая флора Fungal flora	0	0	0	0	0	0	0	0	6	28 $p_1 < 0,001$

Примечание. Статистически достоверные различия: p_1 — с группой контроля. ХАлР — хронический аллергический ринит; ХВР — хронический вазомоторный ринит; ХАР — хронический атрофический ринит; ХИР — хронический инфекционный ринит. Частота встречаемости (в %) рассчитана для каждой в отдельности группы пациентов.

Note. Significant differences: p_1 — vs. control group. CAIR — chronic allergic rhinitis; CVR — chronic vasomotor rhinitis; CAR — chronic atrophic rhinitis; CIR — chronic infectious rhinitis. The frequency of occurrence (in %) was calculated for each individual patient group.

epidermidis чаще встречается в группе с ХАлР, не выявлялся у пациентов с ХИР; *Staphylococcus haemolyticus* чаще встречается в группе с ХАР, не выявлялся у пациентов с ХАлР и ХВР; *Staphylococcus saprophyticus* чаще встречается в группе с ХАР, не выявлялся у пациентов с ХАлР и ХВР.

Во всех исследуемых группах выделены представители рода *Streptococcus*: вид *Streptococcus viridans* чаще встречается в группе с ХАлР, не выявлялся у пациентов с ХИР; вид *Streptococcus pyogenes* чаще встречается в группе с ХИР, реже у пациентов с ХАР, не выявлялся у пациентов с ХАлР, ХВР и у группы контроля.

Во всех исследуемых группах выделены представители рода *Neisseriae*: вид *Neisseria flava* чаще встречается в группе контроля и у пациентов с ХАлР, не выявлялся у пациентов с ХИР; вид *Neisseria mucosa* чаще встречается в группе контроля, меньше у пациентов с ХАлР, не выявлялся у пациентов с ХИР; вид *Neisseria meningitidis* встречается только у пациентов с ХИР.

Представители рода *Acinetobacter* выделены у пациентов с ХИР, меньше у пациентов с ХАР, и единично высеян у пациента из группы контроля. Вид *Acinetobacter pittii* чаще встречается в группе с ХИР, реже у пациентов с ХАР, не выявлялся у пациентов с ХАлР, ХВР и у группы контроля; вид *Acinetobacter baumannii* чаще встречается в группе с ХАР, реже у пациентов с ХИР, единично высеян у пациента из группы контроля, не выявлялся у пациентов с ХАлР, ХВР; вид *Acinetobacter lwoffii* чаще встречается в группе с ХАР, реже у пациентов с ХИР, не выявлялся у пациентов с ХАлР, ХВР и у группы контроля.

Из палочковидных бактерий род *Klebsiella* выявляется чаще у пациентов с ХАР, реже у пациентов из группы контроля и наиболее редко у пациентов с ХВР, не выявляется у пациентов с ХАлР и ХИР; при этом вид *Klebsiella pneumoniae* чаще встречается у пациентов с ХАР, реже у пациентов из группы контроля, а у пациентов с ХВР не выявляется вовсе, а вид *Klebsiella oxytoca* чаще встречается у пацентов с ХАР, реже у пациентов с ХВР и из группы контроля.

Из рода *Escherichia* был выявлен представитель вида *Escherichia coli* только в группе пациентов с ХИР.

Представители рода *Enterobacter* выделены у пациентов с ХАлР, меньше у пациентов с ХИР, не выявлены у пациентов из группы контроля, с ХВР, ХАР; при этом вид *Enterobacter cloacae* выявлен только у пациентов с ХАлР, а представители вида *Enterobacter sakazakii* встречались чаще у пациентов с ХАлР, единично у пациента с ХИР.

Представители рода *Corynebacterium* выделены у пациентов с ХАлР, единично у пациента с ХИР, не выявлены у пациентов из группы контроля, с ХВР, ХАР; при этом вид *Corynebacterium ulcerans* встречался с одинаковой частотой и у пациентов с ХАлР, и у пациентов с ХИР; вид *Corynebacterium striatum* выявлен только у пациентов с ХАлР.

Из рода *Pseudomonas* был выявлен представитель вида *Pseudomonas aeruginosa* только в группе пациентов с ХИР.

Из рода *Proteus* был выявлен представитель вида *Proteus mirabilis* в одинаковом процентном соотношении среди пациентов с ХИР и группы контроля.

Грибковая микрофлора выделена во всех исследованных группах только у пациентов с ХИР, представлена она грибами рода *Candida*.

Следовательно, при всех формах ХР и в группе контроля выявляется микрофлора, но наибольший дисбиоз определяется у пациентов с ХИР, наименьший — при ХВР.

На следующем этапе исследования проведена количественная оценка выделенных представителей микрофлоры (табл. 4).

У больных с ХАлР по данным бактериологического исследования слизистой полости носа выявлено статистически значимое увеличение титров выделенных микроорганизмов рода *Enterobacter* и *Corynebacterium* относительно пациентов с ХВР, ХАР и контрольной группы.

У больных с ХВР по данным бактериологического исследования слизистой полости носа выявлено статистически значимое увеличение титров выделенных микроорганизмов рода *Klebsiella* относительно пациентов с ХАлР, ХИР.

У больных с ХАР по данным бактериологического исследования слизистой полости носа выявлено статистически значимое увеличение титров выделенных микроорганизмов рода *Acinetobacter* относительно пациентов с ХАлР, ХВР; рода *Klebsiella* относительно пациентов с ХАлР, ХВР, ХАР и контрольной группы.

У больных с ХИР по данным бактериологического исследования слизистой полости носа выявлено статистически значимое увеличение титров выделенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* и *Candida* относительно контрольной группы и пациентов с ХАлР, ХВР, ХАР; рода *Neisseriae* относительно контрольной группы и пациентов с ХАлР, ХАР; рода *Acinetobacter* относительно пациентов группы ХАлР, ХВР, ХАР; рода *Corynebacterium* относительно пациентов с ХВР, ХАР и контрольной группы; рода *Proteus* относительно пациентов с ХАлР, ХВР и ХАР.

Таким образом, наибольшее количество титров микроорганизмов определяется при ХИР, наименьшее — при ХВР.

Таблица 3. Род выделенных микроорганизмов со слизистой оболочки полости носа у больных различными вариантами ХР

Table 3. The genus of microorganisms isolated from the nasal cavity mucous membrane in patients with various types of chronic rhinitis

Род и вид выделенного микроорганизма The genus and species of the isolated microorganism	**Контрольная группа** Control group **n = 40 (1)**		**Больные ХАлР** Patients with CAIR **n = 20 (2)**		**Больные ХВР** Patients with CVR **n = 20 (3)**		**Больные ХАР** Patients with CAR **n = 18 (4)**		**Больные ХИР** Patients with CIR **n = 21 (5)**	
	абс. abs.	**%**	**абс.** abs.	**%**	**абс.** abs.	**%**	**абс.** abs.	**%**	**абс.** abs.	**%**
Кокковая флора/Coccal flora										
***Staphylococcus* sp.**	25	63	15	75	6	30	9	50	12	58
Staphylococcus aureus	10	25	3	15	0	0	1	6	9	43
Staphylococcus epidermidis	16	40	13	65	6	30	5	28	0	0
Staphylococcus haemolyticus	1	3	0	0	0	0	2	11	2	10
Staphylococcus saprophyticus	1	3	0	0	0	0	2	11	2	10
***Streptococcus* sp.**	18	45	12	60	8	40	6	33	13	62
Streptococcus viridans	18	45	12	60	8	40	3	17	0	0
Streptococcus pyogenes	0	0	0	0	0	0	3	17	13	62
***Neisseriae* sp.**	17	43	9	45	5	25	3	17	5	24
Neisseria flava	10	25	5	25	3	15	2	11	0	0
Neisseria mucosa	9	23	4	20	2	10	1	6	0	0
Neisseria meningitidis	0	0	0	0	0	0	0	0	5	24
***Acinetobacter* sp.**	1	3	0	0	0	0	4	22	6	29
Acinetobacter pittii	0	0	0	0	0	0	1	6	2	10
Acinetobacter baumannii	1	3	0	0	0	0	2	11	2	10
Acinetobacter lwoffii	0	0	0	0	0	0	2	11	2	10
Палочковидные бактерии/Rod-shaped bacteria										
***Klebsiella* spp.**	5	13	0	0	2	10	7	39	0	0
Klebsiella pneumoniae	2	5	0	0	0	0	7	39	0	0
Klebsiella oxytoca	3	8	0	0	2	10	5	28	0	0
***Escherichia* spp.**	0	0	0	0	0	0	0	0	3	14
Escherichia coli	0	0	0	0	0	0	0	0	3	14
***Enterobacter* spp.**	0	0	3	15	0	0	0	0	1	5
Enterobacter cloacae	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
Enterobacter sakazakii	0	0	2	10	0	0	0	0	1	5
***Corynebacterium* spp.**	0	0	2	10	0	0	0	0	1	5
Corynebacterium ulcerans	0	0	1	5	0	0	0	0	1	5
Corynebacterium striatum	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
***Pseudomonas* spp.**	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
***Proteus* spp.**	2	5	0	0	0	0	0	0	1	5
Proteus mirabilis	2	5	0	0	0	0	0	0	1	5
Грибковая флора/Fungal flora										
***Candida* spp.**	0	0	0	0	0	0	0	0	6	29
Прочая грибковая флора Other fungal flora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. ХАлР — хронический аллергический ринит; ХВР — хронический вазомоторный ринит; ХАР — хронический атрофический ринит; ХИР — хронический инфекционный ринит. Частота встречаемости (в %) рассчитана для каждой в отдельности группы пациентов.

Note. CAIR — chronic allergic rhinitis; CVR — chronic vasomotor rhinitis; CAR — chronic atrophic rhinitis; CIR — chronic infectious rhinitis. The frequency of occurrence (in %) was calculated for each individual patient group.

Таблица 4. Количество выделенных микроорганизмов со слизистой оболочки полости носа у больных различными вариантами ХР

Table 4. The number of microorganisms isolated from the nasal cavity mucous membrane in patients with various types of chronic rhinitis

Род выделенного микроорганизма The genus of the isolated microorganism	**Контрольная группа** Control group **n = 40 (1)**		**Больные ХАлР** Patients with CAIR **n = 20 (2)**		**Больные ХВР** Patients with CVR **n = 20 (3)**		**Больные ХАР** Patients with CAR **n = 18 (4)**		**Больные ХИР** Patients with CIR **n = 21 (5)**	
	Me	**Q_{25}–Q_{75}**	**Me**	**Q_{25}–Q_{75}**	**Me**	**Q_{25}–Q_{75}**	**Me**	**Q_{25}–Q_{75}**	**Me**	**Q_{25}–Q_{75}**
Кокковая флора/Coccal flora										
***Staphylococcus* spp.**	100	100;1000	100	100;1000	10 0	100;1000	100	100;1000	1000	100;1000000
									$p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	
***Streptococcus* spp.**	100	100;1000	100	100;550	550	100;1000	100	100;1000	100000	1000;100000
									$p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} = 0,005$, $p_{4-5} = 0,006$	
***Neisseriae* spp.**	100	100;1000	100	100;1000	100	100;1000	100	100;100	1000	1000;100000
									$p_{1-5} = 0,002$, $p_{2-5} = 0,03$, $p_{4-5} = 0,01$	
***Acinetobacter* spp.**	100	100;100	0	0	0	0	100	10;100	1000	1000;10000
			$p_{1-2} < 0,001$				$p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$		$p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} = 0,01$	
Палочковидные бактерии/Rod-shaped bacteria										
***Klebsiella* spp.**	100	100;100	0	0	550	100;1000	10000	10000;100000	0	0
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} = 0,002$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} = 0,03$		$p_{1-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	
Escherichia spp	0	0	0	0	0	0	0	0	55000	10000;100000
									$p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	
***Enterobacter* spp.**	0	0	100	100;1000	0	0	0	0	10000	10000;10000
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{2-3} < 0,001$		$p_{2-4} < 0,001$		$p_{1-5} < 0,001$ $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	
***Corynebacterium* spp.**	0	0	550	100;1000	0	0	0	0	1000	1000;1000
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{2-3} < 0,001$		$p_{2-4} < 0,001$		$p_{1-5} < 0,001$ $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	
***Pseudomonas* spp.**	0	0	0	0	0	0	0	0	1000	1000;1000
									$p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	

Род выделенного микроорганизма The genus of the isolated microorganism	Контрольная группа Control group n = 40 (1)		Больные ХАлР Patients with CAIR n = 20 (2)		Больные ХВР Patients with CVR n = 20 (3)		Больные ХАР Patients with CAR n = 18 (4)		Больные ХИР Patients with CIR n = 21 (5)	
	Me	Q_{25}–Q_{75}	Me	Q_{25}–Q_{75}	Me	Q_{25}–Q_{75}	Me	Q_{25}–Q_{75}	Me	Q_{25}–Q_{75}
***Proteus* spp.**	100	100;100	0	0	0	0	0	0	10000	10000;10000
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$		$p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	
Грибковая флора/Fungal flora										
***Candida* sp.**	0	0	0	0	0	0	0	0	5500	1000;10000
									$p_{1-5} < 0,001$, $p_{2-5} < 0,001$, $p_{3-5} < 0,001$, $p_{4-5} < 0,001$	

Примечание. Достоверные различия: p_{1-2} — между группой ХАлР и контрольной группой; p_{1-3} — между группой ХВР и контрольной группой; p_{1-4} — между группой ХАР и контрольной группой; p_{1-5} — между группой ХИР и контрольной группой; p_{2-3} — между группами ХАлР и ХВР; p_{2-4} — между группами ХАлР и ХАР; p_{2-5} — между группами ХАлР и ХИР; p_{3-4} — между группами ХВР и ХАР; p_{3-5} — между группами ХВР и ХИР; p_{4-5} — между группами ХАР и ХИР; ХАлР — хронический аллергический ринит; ХВР — хронический вазомоторный ринит; ХАР — хронический атрофический ринит; ХИР — хронический инфекционный ринит.

Note. Significant differences: p_{1-2} — between the CAIR group and the control group; p_{1-3} — between the CVR group and the control group; p_{1-4} — between the CAR group and the control group; p_{1-5} — between the CIR group and the control group; p_{2-3} — between CAIR and CVR groups; p_{2-4} — between CAIR and CAR groups; p_{2-5} — between the CAIR and CIR groups; p_{3-4} — between CVR and CAR groups; p_{3-5} — between CVR and CIR groups; p_{4-5} — between the CAR and CIR groups; CAIR — chronic allergic rhinitis; CVR — chronic vasomotor rhinitis; CAR — chronic atrophic rhinitis; CIR — chronic infectious rhinitis.

Обсуждение

У пациентов из группы контроля в большинстве случаев присутствует микрофлора (80%). Микробиоценоз полости носа — динамичное состояние, композицию которого составляют множество микроорганизмов как постоянно персистирующих на слизистых оболочках дыхательных путей, так и случайно попадающих в нос с вдыхаемым воздухом [1, 13]. У пациентов с ХИР микрофлора присутствует в 100% случаев, что объясняется этиологией данного заболевания — наличием инфекционных агентов. Наименьшее количество представителей микробиоты выявлено у пациентов с ХВР, что вероятно обусловлено активным механическим очищением слизью слизистой носовой полости и частым использованием в лечении таких больных интраназальных глюкокортикостероидов с противовоспалительным действием и сосудосуживающих спреев [6, 16].

В группе контроля выявлен рост кокковой и палочковой флоры, у больных ХИР определяются все представители микробиоты: кокки, палочки и грибы, появление последних, вероятно, обусловлено частым лечением антибактериальными лекарственными средствами. При ХАР доля палочковидных бактерий преобладает относительно всех других форм ринита и контрольной группы и связана с частым обнаружением *Klebsiella* spp., являющейся одним из главных этиологических факторов развития атрофии слизистой оболочки полости носа.

При оценке кокковой флоры у здоровых пациентов выявляются представители рода *Staphylococcus* (чаще всего *Staphylococcus epidermidis)*, эти же микроорганизмы обнаружены при ХАл, ХВР, ХАР. Известно, что при длительных ринитах в 25–28% проб при исследовании из отделяемого полости носа и носоглотки находят *Staphylococcus epidermidis* [14]. Его штаммы, выделенные при различных воспалительных процессах, обладают рядом генов вирулентности, ответственных за адгезию, инвазию, распространение и персистенцию микроорганизмов, благодаря наличию адгезинов, токсинов и ферментов, позволяющих «уходить» от воздействия иммунной системы хозяина и вызывать в месте локализации инфекционный процесс [18]. При ХИР на первом месте среди представителей рода *Staphylococcus* выявлялся вид *Staphylococcus aureus. Staphylococcus aureus* является доказанным патогенным представителем микробиоты полости носа, способствующим хронизации воспаления при ринитах различного генеза [15]. Уникальная способность *Staphylococcus aureus* продуцировать энтеротоксины со свойствами суперантигенов, влияющих на локальную поликлональную активность лимфоцитов, по-

зволяет этому микроорганизму занимать одно из доминирующих положений в микробиоте верхних дыхательных путей [1].

Флора из рода *Streptococcus* представлена *Streptococcus viridans*, выявлена у всех пациентов с ХР, кроме больных из группы с ХИР. При ХИР микрофлора рода *Streptococcus* представлена *Streptococcus pyogenes*, ответственным за появление гнойного отделяемого из полости носа.

В контрольной группе род *Neisseriae* представлен видами *Neisseria flava*, *Neisseria mucosa*, аналогичные у всех пациентов с ХР, кроме больных с ХИР, где обнаруживается патогенный *Neisseria meningitidis*, способный утяжелить клиническое течение ХР.

Acinetobacter в группе контроля представлен видом *Acinetobacter baumannii*. При ХАР и ХИР выявляются 3 представителя данного рода: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii* и — в наименьшем количестве — *Acinetobacter pittii* при ХАР.

У практически здоровых добровольцев бактерии рода *Klebsiella* представлены видами *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*. При ХВР выявляется только *Klebsiella oxytoca*. Практически у всех пациентов с ХАР выявляются все изученные виды микроорганизмов рода *Klebsiella*, что указывает на важнейшую патогенетическую роль данного возбудителя в развитии дегенеративных изменений эпителиоцитов при атрофическом рините.

Микрофлора рода *Enterobacter* обнаруживается при ХАлР *(Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii)* и ХИР *(Enterobacter sakazakii)*. Увеличение представительства условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriacea* на слизистой оболочке носа при ХР свидетельствует о дисбиотическом изменении и их несомненной роли в развитии воспалительного процесса [7]. Микрофлора рода *Corynebacterium* встречается при ХАлР *(Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium striatum)* и ХИР *(Corynebacterium ulcerans)*.

Род *Proteus*, а именно вид *Proteus mirabilis*, встречается в одинаковом процентном соотношении у пациентов из группы контроля и у пациентов с ХИР. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida* встречаются только у пациентов с ХИР.

У пациентов с ХИР из кокковой флоры выявлено статистически значимое увеличение титров выделенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseriae* относительно контрольной группы. Из палочковидной флоры у пациентов с ХАлР выявлено статистически значимое увеличение титров представителей рода *Enterobacter, Corynebacterium* относительно контрольной группы, у пациентов с ХВР и ХАР — увеличение титра микроорганизмов рода *Klebsiella* относительно контрольной группы, у пациентов с ХИР статистически значимое увеличение титров высеянной микрофлоры рода *Klebsiella, Escherichia, Enterobacter, Corynebacterium, Pseudomonas* относительно контрольной группы. Титры рода *Candida* определяются только при ХИР.

По результатам нашего исследования можно сделать заключение, что при воспалении в слизистой оболочке полости носа, независимо от его этиологии, происходит изменение количественного и видового состава микрофлоры. Мы считаем, что изменение микробиоты влияет на патогенез заболевания, способствует персистированию патогенных и/или условно-патогенных микроорганизмов. Утяжеление течения патологического процесса в этом случае связывают со способностью антигенов бактерий проявлять свойства суперантигенов и индуцировать активацию Т-лимфоцитов [9].

В контрольной группе в микрофлоре слизистой оболочки полости носа выявляются микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria flava*, *Neisseria mucosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, которые не вызывают патологических изменений, и это свидетельствует о высокой активности локального и системного иммунитета в данный момент у практически здоровых лиц. Интересным фактом является выявление *Proteus mirabilis* и *Acinetobacter baumannii* у здоровых добровольцев при отсутствии у них клинических проявлений инфицирования, следовательно, возможно сосуществование с условно-патогенной флорой при сохранной функции иммунной системы, что доказывает отсутствие необходимости постоянной санации микрофлоры слизистой оболочки полости носа.

При ХАлР выявляются *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria flava*, *Neisseria mucosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium striatum*. Вероятнее всего данные микроорганизмы продуктами своей жизнедеятельности пролонгируют воспалительную реакцию, персистируют, вызывают сенсибилизацию организма с последующими гиперреактивными иммунными реакциями.

При ХВР выявляются *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria flava*, *Neisseria mucosa*, *Klebsiella oxytoca*, но в небольшом количестве, что связано с особенностями течения данного заболевания и терапии, и отражает обратимые изменения в слизистой оболочке полости носа.

При ХАР выявляются представители *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

Staphylococcus haemolyticus, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria flava*, *Neisseria mucosa*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, но преобладает — род *Klebsiella (Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca)*, представители которого ответственны за дегенеративно-дистрофические изменения в эпителиоцитах слизистой оболочки полости носа, вызывая и усиливая ее атрофию.

При ХИР выявляются представители *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Corynebacterium ulcerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida*. Выявлено отсутствие и/или снижение количества представителей нормофлоры, чаще выявляются патогенные и условно-патогенные бактерии, имеется самый выраженный дисбиоз микрофлоры слизистой оболочки полости носа по сравнению со всеми другими ХР, которые обуславливают длительность и тяжесть клинического течения. Особенностью при ХИР является появление роста грибковой флоры, возможно это обусловлено частыми антибактериальными курсами терапии и отсутствием реабилитации с целью восстановления нормофлоры.

Список литературы/References

1. Батуро А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А. Доминирование Staphylococcus aureus в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 1. С. 72–74. [Baturo A.P., Romanenko E.E., Leonova A.Yu., Yartseva A.S., Savlevich E.L., Mokronosova M.A. Domination of Staphylococcus aureus in microbiocenosis of nasal cavity in children and adults with infectious and allergic rhinitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2015, no. 1, pp. 72–74. (In Russ.)*]
2. Блоцкий А.А., Карпищенко С.А., Блоцкий Р.А. Сравнительный анализ эффективности хирургического лечения хронического ринита в амбулаторных условиях // Дальневосточный медицинский журнал. 2012. № 4. С. 82–85. [Blotsky A.A., Karpishchenko S.A., Blotsky R.A. Comparative analysis of the effectiveness of surgical treatment of chronic rhinitis on an outpatient basis. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal = Far Eastern Medical Journal, 2012, no. 4, pp. 82–85. (In Russ.)*]
3. Бодня О.С. Дифференциальный диагноз аллергического и неаллергического ринита: фенотипы и эндотипы // Практическая аллергология. 2021. № 2. С. 86–94. [Bodnya O.S. Differential diagnosis of allergic and non-allergic rhinitis: phenotypes and endotypes. *Prakticheskaya allergologiya = Practical Allergology, 2021, no. 2, pp. 86–94. (In Russ.)*] *doi: 10.46393/2712-9667_2021_2_86_94*
4. Карпова Е.П., Бараташвили А.Д. Фенотипическая классификация ринитов и основные принципы терапии // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. 2019. Т. 8, № 3. С. 33–36. [Karpova E.P., Baratashvili A.D. Phenotypic classification of rhinitis and basic principles of therapy. *Russkii meditsinskii zhurnal. Meditsinskoe obozrenie = Russian Medical Journal. Medical Review. 2019. Vol. 8, № 3, pp. 33–36. (In Russ.)*]
5. Крылова Т.А., Завалий М.А., Балабанцев А.Г. Дифференциальная диагностика аллергического и неаллергического хронического ринита // Практическая медицина. 2015. Т. 13, № 2 (87). С. 13–18. [Krylova T.A., Zavaliy M.A., Balabantsev A.G. Differential diagnosis of allergic and non-allergic chronic rhinitis. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine. 2015. vol. 13, no. 2 (87), pp. 13–18. (In Russ.)*]
6. Лопатин А.С., Варвянская А.В. Вазомоторный ринит: патогенез, клиника, диагностика и возможности консервативного лечения // Практическая пульмонология. 2007. № 2. С. 33–38. [Lopatin A.S., Varvyanskaya A.V. Vasomotor rhinitis: pathogenesis, clinic, diagnosis and possibilities of conservative treatment. *Prakticheskaya pul'monologiya = Practical Pulmonology, 2007, no. 2, pp. 33–38. (In Russ.)*]
7. Мельник А.М., Воронов А.В., Дворянчиков В.В., Исаченко В.С., Ачба Р.Р. Состояние микрофлоры полости носа при полипозном риносинусите // Российская оториноларингология. 2017. Т. 1, № 86. С. 73–82. [Melnik A.M., Voronov A.V., Dvoryanchikov V.V., Isachenko V.S., Achba R.R. The state of the microflora of the nasal cavity with polypous rhinosinusitis. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology, 2017, vol. 1, no. 86, pp. 73–82. (In Russ.)*]
8. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология: бактериологические исследования; микологические исследования; паразитологические исследования; инфекционная иммунодиагностика; молекулярная диагностика инфекционных заболеваний / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Лабора, 2009. 880 с. [Methods of clinical laboratory tests: a reference manual. Vol. 3. Clinical microbiology: bacteriological studies; mycological studies; parasitological studies; infectious immunodiagnostics; molecular diagnosis of infectious diseases. Ed. by V.V. Menshikov. *Moscow: Labora, 2009. 880 p. (In Russ.)*]
9. Пухаева М.О., Галуева З.Р., Михайлиди Е.Ф. Микробный биоценоз при аллергическом рините у детей // Альманах мировой науки. 2017. Т. 5, № 20. С. 21–22. [Pukhaeva M.O., Galueva Z.R., Mikhailidi E.F. Microbial biocenosis in allergic rhinitis in children. *Al'manakh mirovoi nauki = Almanac of World Science, 2017, vol. 5, no. 20, pp. 21–22. (In Russ.)*]
10. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т., Клинико-иммунологические проявления и нарушения метаболизма внутриклеточных ферментов лимфоцитов у больных хроническим лимфолейкозом // Сибирский онкологический журнал. 2007. № 2. С. 15–21. [Smirnova O.V., Savchenko A.A., Manchuk V.T., Clinical and immunological manifestations and metabolic disorders of intracellular lymphocyte enzymes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology, 2007, no. 2, pp. 15–21. (In Russ.)*]
11. Смирнова О.В., Титова Н.М., Елманова Н.Г. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов больных механической желтухой доброкачественного генеза // Российский иммунологический журнал.

2015. Т. 9, № 2-1 (18). С. 313-315. [Smirnova O.V., Titova N.M., Elmanova N.G. Peculiarities of chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in patients with obstructive jaundice of benign genesis. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2015, vol. 9, no. 2-1 (18), pp. 313–315. (In Russ.)*]

12. Смирнова О.В., Титова Н.М., Манчук В.Т., Елманова Н.Г., Кочетова Л.В., Пахомова Р.А. Особенности клеточного звена иммунитета у больных механической желтухой доброкачественного генеза в зависимости от уровня билирубина // Фундаментальные исследования. 2015. № 2–10. С. 2174–2179. [Smirnova O.V., Titova N.M., Manchuk V.T., Elmanova N.G., Kochetova L.V., Pakhomova R.A. Features of the cellular link of immunity in patients with benign obstructive jaundice depending on the level of bilirubin. *Fundamental'nye issledovaniya = Basic Research, 2015, no. 2–10, pp. 2174–2179. (In Russ.)*]
13. Foreman A., Wormald P. Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. *Laryngoscope, 2010, vol. 120: 1701. doi: 10.1002/lary.21024*
14. Lewenza S., Charron-Mazenod L., Cho J.J., Mechor B. Identification of bacterial contaminants in sinus irrigation bottles from chronic rhinosinusitis patients. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg., 2010. vol. 39, pp. 458–463.*
15. Lina G., Boutite F., Tristan A., Bes M., Etienne J., Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. *Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol. 69, pp. 18–23. doi: 10.1128/aem.69.1.18-23.2003*
16. Wallace D.V., Dykewicz M.S., Kaliner M.A. Classification of nonallergic rhinitis syndromes with a focus on vasomotor rhinitis, proposed to be known henceforth as nonallergic rhinopathy. *World Allergy Organ. J., 2009, vol. 2, pp. 98–101. doi: 10.1097/WOX.0b013e3181a9d55b*
17. Zhang Y.Q., Ren S.X., Li H.L., Wang Y.X., Fu G., Yang J., Qin Z.Q., Miao Y.G., Wang W.Y., Chen R.S., Shen Y., Chen Z., Yuan Z.H., Zhao G.P., Qu D., Danchin A., Wen Y.M. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol., 2003, vol. 49, pp. 1577–1593. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03671.x*

Авторы:

Смирнова О.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клинической патофизиологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Гончарова Н.С., аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Smirnova O.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Clinical Pathophysiology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Goncharova N.S., PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.03.2023
Принята к печати 02.05.2023

Received 22.03.2023
Accepted 02.05.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 517–525

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 517–525

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Л.Ю. Отдушкина, Ю.В. Захарова, А.А. Холодов, Т.В. Пьянзова

ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Резюме. У пациентов с туберкулезом легких и множественной устойчивостью возбудителя (МЛУ) на фоне длительной многокомпонентной химиотерапии развиваются стойкие нарушения кишечного микробиома, которые требуют коррекции. Однако имеются ограниченные данные по применению бактерийных препаратов у пациентов с туберкулезом с последующей оценкой их эффективности. Цель исследования — оценить изменения кишечного микробиома после курса пробиотиков на фоне противотуберкулезной химиотерапии у пациентов с МЛУ туберкулезом. *Материалы и методы.* Дизайн исследования — проспективное, на связанной выборке малого объема (n = 30). Пациенты с туберкулезом легких получали противотуберкулезные препараты по IV или V режиму, медиана принятых доз составила 34,5 (30; 57,5); у всех включенных в исследование регистрировали гастроинтестинальный синдром. Пробиотикотерапия проводилась препаратом, содержащим *Bifidobacterium bifidum* и *B. animalis* и *Lactobacillus casei, L. plantarum, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. acidophilus.* Курс приема составил 21 день, по 1 капсуле 2 раза в день. До начала и спустя 7 дней после окончания приема пробиотиков проводили исследования состава кишечной микробиоты, изучали частоту факторов вирулентности *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp.; исследовали жирнокислотный состав и активность продукции органических кислот энтерококками. *Результаты.* После курса приема пробиотиков регистрировали статистически значимое повышение титров лактобацилл с 5,2 (4,0; 6,0) до 6,1 (6,0; 8,0) lg КОЕ/г (p = 0,05). Снизилась частота колонизации слизистой грибами рода *Candida* в 2 раза (p = 0,001) и лактозонегативными эшерихиями в 3 раза (p = 0,05). Достоверно уменьшилась частота обнаружения штаммов, обладающих вирулентностью: в 9 раз — стафилококков, продуцирующих гемолизины (p = 0,009), в 6 раз — энтерококков с желатиназной активностью (p = 0,05) и в 2 раза — обладающих липазной активностью (p = 0,05). В составе мембраны *E. faecalis* достоверно увеличилась масса олеиновой кислоты (C9-C18:1) (p = 0,03). У *E. faecium* в 2 раза увеличилась масса цис-7-пальмитолеиновой (C 7-C16:1) и олеиновой (C9-C18:1) жирных кислот (p = 0,05), в 4 раза увеличилось содержание линолевой (C18:2) кислоты (p = 0,04), что сопровождалось ростом кислотообразования в 1,5 раза. *Заключение.* Однократный курс пробиотикотерапии у пациентов с туберкулезом легких приводит к качественным изменениям микробиома, которые характеризуются снижением уровней условно-патогенных микроорганизмов с вирулентными свойствами и изменением состава клеточной мембраны энтерококков, что сопровождается повышением их биохимической активности.

Ключевые слова: *пробиотики, туберкулез легких, микробиом, терапия, свойства микроорганизмов.*

Адрес для переписки:
Отдушкина Лариса Юрьевна
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а, ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России.
Тел.: 8 (3842) 73-28-71 (служебн.); 8 950 578-87-16 (моб.).
E-mail: lara276@mail.ru

Contacts:
Larisa Yu. Otdushkina
650056, Russian Federation, Kemerovo, Voroshilova str., 22a, Kemerovo State Medical University.
Phone: +7 (3842) 73-28-71 (office); 8 950 578-87-16 (mobile).
E-mail: lara276@mail.ru

Для цитирования:
Отдушкина Л.Ю., Захарова Ю.В., Холодов А.А., Пьянзова Т.В. Микробиологическая оценка результатов пробиотикотерапии у пациентов с туберкулезом легких // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 517–525. doi: 10.15789/2220-7619-MEO-7223

Citation:
Otdushkina L.Yu., Zakharova Yu.V., Kholodov A.A., Pyanzova T.V. Microbiological evaluation of probiotic therapy in patients with pulmonary tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 517–525. doi: 10.15789/2220-7619-MEO-7223

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MEO-7223

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF PROBIOTIC THERAPY IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Otdushkina L.Yu., Zakharova Yu.V., Kholodov A.A., Pyanzova T.V.

Kemerovo State Medical Academy of Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Patients with pulmonary tuberculosis and multiple pathogen resistance (MDR) develop persistent disorders of the intestinal microbiome during prolonged multicomponent chemotherapy requiring correction. However, there is limited data on the use of bacterial drugs in patients with tuberculosis followed by assessing their effectiveness. The aim of the study was to evaluate changes in the intestinal microbiome after a course of probiotics along with anti-tuberculosis chemotherapy in patients with MDR tuberculosis. *Materials and methods.* The design — a prospective small-cohort study (n = 30). Patients with pulmonary tuberculosis received anti-tuberculosis drugs according to the IV or V regimen, the median of the doses taken was 34.5 (30; 57.5); gastrointestinal syndrome was recorded in all study subjects. Probiotic therapy was applied by using a preparation containing *Bifidobacterium bifidum* and *B. animalis* and *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, *L. acidophilus*. The course of therapy comprised 21 days, 1 capsule twice a day. Before and 7 days after probiotics therapy, studies on composition of the intestinal microbiota were carried out, the frequency of virulence factors *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. was examined; fatty acid composition and activity of enterococcal organic acid production were studied. *Results.* After a course of probiotics, a significant increase in lactobacillus titers was recorded from 5.2 (4.0; 6.0) to 6.1 (6.0; 8.0) lg CFU/g ($p = 0.05$). The frequency of mucosal colonization by *Candida* fungi and lactose-negative Escherichia decreased by 2-fold ($p = 0.001$) and 3-fold ($p = 0.05$), respectively. The frequency of detected virulent strains significantly decreased: hemolysin-producing staphylococci — by 9 times ($p = 0.009$), enterococci with gelatinase activity — by 6 times. *E. faecalis* membrane oleic acid level significantly increased (C9-C18:1) ($p = 0.03$). In *E. faecium*, cis-7-palmitoleic acid (C7-C16:1) and oleic (C9-C18:1) fatty acid level increased by 2-fold ($p = 0.05$), and for linoleic acid (C18:2) — by 4 time ($p = 0.04$) accompanied by elevated acid formation by 1.5 times. *Conclusion.* A single course of probiotic therapy in patients with pulmonary tuberculosis leads to qualitative microbiome changes, which are characterized by decreased levels of conditionally pathogenic microorganisms with virulent properties and altered composition of the enterococcal cell membrane accompanied by their increased biochemical activity.

Key words: *probiotics, pulmonary tuberculosis, microbiome, therapy, properties of microorganisms.*

Введение

Микробиом человека — это фундаментальная основа его здоровья. Микробиота оказывает влияние на все виды обмена веществ человека, иммунологическую реактивность, пищеварение, детоксикацию, реализацию генетической программы, а также ассоциирована с развитием некоторых заболеваний [2, 3]. В настоящее время применение биологических препаратов на основе живых микроорганизмов в схемах лечения пациентов с различной нозологией позволяет снизить тяжесть основного заболевания, предупредить развитие осложнений и побочных эффектов от антимикробных препаратов [3, 8, 17].

Сохранение и коррекция кишечного микробиома у пациентов с туберкулезом приобретает все большую значимость, в связи с необходимостью улучшения качества и продолжительности жизни больных при длительной многокомпонентной противотуберкулезной терапии, обусловливающей стойкие нарушения микробиоты [16]. Дисбаланс в микробиоме сопровождается появлением гастроинтестинального синдрома, формированием резистентности возбудителей на фоне мальабсорбции и снижением комплаентности пациентов к лечению [14, 27]. Поэтому пациенты фтизиатрического профиля нуждаются в стабильной, функционально активной микробиоте.

В настоящее время имеются ограниченные данные по использованию бактерийных иммунобиологических препаратов на фоне этиотропной терапии у пациентов с туберкулезом, вызванным штаммами микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [16]. Поэтому сложно говорить о длительности и количестве курсов пробиотикотерапии для туберкулезных пациентов, о характере влияния комбинированной терапии на тяжесть заболевания и эффективность противотуберкулезных препаратов в отношении резистентных возбудителей. Для оптимизации пробиотикотерапии в когорте пациентов фтизиатрического профиля необходимо понимать характер воздействия пробиотических штаммов на состав и функциональное состояние микробиоты после их применения по стандартным схемам, зависимость клинической эффективности от степени восстановления количества и видового состава микробиоты.

Цель исследования — оценить изменения кишечного микробиома после курса пробиотиков на фоне противотуберкулезной химиотерапии у пациентов с МЛУ туберкулезом.

Материалы и методы

Дизайн исследования — проспективное на связанной выборке малого объема (n = 30). Группа была сформирована на принципах добровольности и информированности на базе Кузбасского клинического фтизиопульмонологического медицинского центра имени И.Ф. Копыловой (протокол этического комитета ФГБОУ ВО КемГМУ № 290/к от 14.09.2021). Средний возраст пациентов составил 45±6 лет. Распределение по полу было таковым: 21 мужчина (70%) и 9 женщин (30%). Противотуберкулезная терапия включала фторированные хинолоны (Fq), бедаквилин (Bq), аминогликозиды, циклосерин (Cs), пиразинамид (Z), пара-аминосалициловую кислоту (PAS), линезолид (Lzd), этамбутол (E). Комбинация препаратов была регламентирована клиническими рекомендациям и подбиралась в соответствии с клиническим течением заболевания [19]. Критерии включения в группу: туберкулез органов дыхания, МЛУ возбудителя, прием не менее 30 доз противотуберкулезных препаратов по IV или V режиму химиотерапии, наличие гастроинтестинального синдрома как следствие этиотропной терапии. Критерии исключения из исследования: воспалительные и инфекционные заболевания печени, кишечника; прием пробиотических препаратов менее чем за 2 месяца до начала исследования.

Гастроинтестинальный синдром у пациентов проявлялся тошной (66,6%), метеоризмом (56,6%), болевым абдоминальным синдромом (46,6%), диареей (36,6%), запорами (33,3%). На момент развития гастроинтестинального синдрома медиана принятых доз противотуберкулезных препаратов составила 34,5 (30; 57,5). Курс приема биопрепарата составил 21 день. В состав препарата входила композиция из 2 видов бифидобактерий *(Bifidobacterium bifidum* и *B. animalis)* и 4 видов лактобацилл *(Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus)*. Форма препарата — кишечнорастворимая капсула. Содержание бифидобактерий в дозе препарата составило $2{,}2 \times 10^9$ КОЕ, лактобацилл — $2{,}6 \times 10^9$ КОЕ [7]. Пациенты принимали пробиотический препарат по 1 капсуле 2 р/сут под контролем медицинских работников среднего звена.

Исследование микробиома кишечника проводили до начала пробиотикотерапии и спустя 7 дней после окончания приема препарата. В качестве материала использовали фекалии, которые в количестве не менее 1–3 г собирали утром в стерильные емкости (ООО «Полимерные изделия», Россия). Транспортировку в лабораторию проводили в течение 2 ч. Готовили десятикратные разведения материала и проводили посев на селективные и дифференциально-диагностические среды. Идентифицировали выделенные чистые культуры микробов с помощью коммерческих тест-систем производства Lachema diagnostica s.r.o, Чехия. Было выделено 116 штаммов энтерококков, 38 штаммов стафилококков, 53 культуры грибов рода *Candida*.

Проведено исследование частоты экспрессии факторов вирулентности у условно-патогенных микроорганизмов. Определение синтеза гемолизинов проводили на 5% кровяном мясо-пептонном агаре, липаз — на агаре с трибутирином (HIMEDIA, Индия). Протеолитические свойства изучали с помощью набора «МикроЖелатиназа» (НИЦФ, Санкт-Петербург).

Кислотообразование у микроорганизмов изучали титрометрическим методом с помощью 0,1 н раствора гидроксида натрия. Титровали бульонную культуру бактерий (V = 10 мл) в присутствии фенолфталеина до появления стойкого слабо-розового окрашивания, которое не исчезало в течение 3 мин. Титруемая кислотность выражается в условных градусах Тернера (°Т).

Состав жирных кислот энтерококков исследовали с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС). Липидную фракцию клеточных стенок энтерококков выделяли из отмытой культуры, выращенной на мясо-пептонном бульоне. Пробоподготовка заключалась в том, что к образцу добавляли 1 мл 5% раствора H_2SO_4 в MeOH и 300 мкл толуола. К полученному раствору добавляли внутренний стандарт (1 мкг метилундеканоата). Затем образец нагревали при 90°C в течение часа. Далее проводили экстракцию с помощью 700 мкл гексана. Объем отобранной гексановой фракции концентрировали отдувкой растворителя до объема 200 мкл. Полученные пробы, содержащие жирные кислоты в виде метиловых эфиров, использовали для анализа. Анализ проводили на хроматомасс-спектрометре Agilent 7000B. Объем пробы 2 мкл, ввод без деления потока. Колонка: ZB-WAX, 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Условия хроматографирования: Oven Program 100°C до 0 мин затем 8°C/мин до 250°C — 5 мин, Flow — 1 мл/мин.

Накопление, систематизация исходной информации и визуализация полученных данных были реализованы в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистическую обработку результатов, полученных на парных выборках осуществляли с помощью сервиса IBM SPSS Statistics/PS IMAGO. Проверку нулевых гипотез о распределении данных осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Применяли непараметрические методы статистики (критерий W-критерий Уилкоксона, критерий χ^2), так как полученные результаты

отличались от нормального распределения. Цифровой материал представлен в виде относительных показателей (%) и в виде медианы с 1 и 3 квартилями [Me (LQ; UQ)]. Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимался равным или менее 0,05.

Результаты

Результаты бактериологического исследования кишечного микробиома показали, что у пациентов с туберкулезом органов дыхания, получавших химиотерапевтические средства, отмечены сниженные относительно региональных значений [25] титры микроорганизмов *Bifidobacterium* до 7,5 (7,0; 8,0) lg КОЕ/г, *Lactobacillus* до 5,2 (4,0; 6,0) lg КОЕ/г, *Escherichia coli* lac+ до 6,5 (4,0; 6,0) lg КОЕ/г, *Enterococcus faecalis* до 5,5 (5,0; 6,0) lg КОЕ/г, *E. faecium* до 5,6 (5,0; 6,0) lg КОЕ/г.

У 60% пациентов из кишечного микробиома выделяли *Staphylococcus* spp. с количественным уровнем 2,1 (1,0; 4,0) lg КОЕ/г, а грибы рода *Candida* — у 93% больных в титрах 3,7 (3,0; 4,0) lg КОЕ/г. Установлена высокая частота колонизации слизистой кишечника пациентов с туберкулезом анаэробными грамположительными клостридиями — *Clostridium perfringens* (36%), количественные уровни которых в среднем составили 1,5 (1,0; 2,0) lg КОЕ/г. У 33% пациентов в кишечном микробиоме обнаруживали лактозонегативные кишечные палочки в титрах 4 (1,0; 5,0) lg КОЕ/г.

После курса пробиотикотерапии статистически значимых различий по изменению колонизационных уровней большинства резидентов кишечного микробиома не выявлено. Титры бифидобактерий не достигли региональных значений нормы, так как увеличились до 7,8 (7,0; 8,0) lg КОЕ/г ($p = 0,35$). Количественный уровень лактозопозитивных эшерихий остался низким и не превышал 6,7 (5,0; 6,0) lg КОЕ/г ($p = 0,55$). Не изменился и уровень энтерококков: *E. faecalis* — 5,3 (4,0; 7,0) lg КОЕ/г ($p = 0,81$), *E. faecium* — 5,7 (5,0; 7,0) lg КОЕ/г ($p = 0,95$). Среди представителей резидентной микробиоты отмечали только статистически значимое повышение титров лактобацилл до 6,1 (6,0; 8,0) lg КОЕ/г по сравнению с исходным значением ($p = 0,05$). После приема бактерийных препаратов снизилась до 46,6% частота обнаружения стафилококков ($p = 0,98$). Они имели низкий количественный уровень равный 1,5 (1,0; 3,0) lg КОЕ/г, но он статистически не отличался от исходных титров ($p = 0,33$). Значимо изменилось содержание и частота обнаружения грибов рода *Candida*. После пробиотикотерапии грибы были выделены только у 46,7% пациентов ($p = 0,001$), их средний количественный уровень достигал региональных значений нормы и составил 2,1 (1,0; 5,0) lg КОЕ/г ($p = 0,03$). Также снизилась до 10% частота колонизации слизистой эшерихиями со слабыми ферментативными свойствами ($p = 0,05$), а их титры в среднем составили 1,6 (1,0; 6,0) lg КОЕ/г ($p = 0,026$).

Далее была проведена оценка влияния приема пробиотиков на вирулентность условно-патогенной микробиоты. Установлено, что результатом приема биопрепаратов стало снижение продукции гемолизинов. Так, частота выделения гемолизинпродуцирующих стафилококков до курса пробиотиков была 38%, после — 2% ($p = 0,009$), среди энтерококков 7% штаммов выделяли цитолизины (гемолизины), после приема курса пробиотиков энтерококков с гемолитической активностью выделено не было. Кроме продукции цитотоксинов у энтерококков после коррекции микробиома пробиотиками достоверно уменьшилось число штаммов с липазной активностью — с 18,6 до 8,8% ($p = 0,05$), а также продуцирующих протеолитические ферменты — с 12 до 2% ($p = 0,05$). Однако, среди микромицетов рода *Candida* сохранилась высокая частота обнаружения культур, продуцирующих липазу, которая составила до коррекции 38%, после — 31,5% ($p = 0,7$).

В связи с тем, что в состав пробиотического препарата входили анаэробные представители «филометаболического звена микробиома», осуществляющего регуляцию состава и свойств всего сообщества микроорганизмов (лактобациллы и бифидобактерии), одной из задач исследования была оценка их влияния на биологические свойства других микросимбионтов, в частности энтерококков. Предметом исследования стал жирнокислотный состав бактериальной мембраны бактерий рода *Enterococcus* до и после курса пробиотикотерапии с последующей косвенной оценкой биохимической активности энтерококков на основе активности кислотообразования в процессе ферментирования углеводов.

В целом у энтерококков в составе клеточных мембран были детектированы 9 насыщенных и 9 ненасыщенных жирных кислот (табл.), общая масса которых у разных видов энтерококков до и после применения пробиотических штаммов не отличалась ($p > 0,05$). У *E. faecalis* изменилось содержание отдельных жирных кислот с насыщенной и ненасыщенной ацильной цепью. После приема пробиотиков повысилось в 10 раз содержание маргариновой (C17:0) ($p = 0,04$) и олеиновой (C9-C18:1) жирных кислот ($p = 0,03$).

У *E. faecium* в 11 раз возросла масса насыщенной лауриновой кислоты (C12:0) ($p = 0,001$) и в 10 раз увеличилось содержание длинноцепочечной насыщенной лигноцериновой кисло-

Таблица. Состав и содержание жирных кислот в клеточных мембранах микроорганизмов рода *Enterococcus* от фтизиатрических пациентов (в мкг на 0,01 г сухого остатка)

Table. Composition and level of cell membrane fatty acids in genus *Enterococcus* from phthisiological patients (in micrograms per 0.01 g of dry pellet)

Химическая формула Chemical formula	Название жирной кислоты (тривиальное) The name of the fatty acid (trivial)	*Enterococcus faecalis* (n = 5)		*Enterococcus faecium* (n = 5)	
		До пробиотиков Before probiotic therapy	После пробиотиков After probiotic therapy	До пробиотиков Before probiotic therapy	После пробиотиков After probiotic therapy
Насыщенные жирные кислоты Saturated fatty acids		0,0681	0,071	0,0761	0,081
C12:0	**Лауриновая** Lauric acid	0,001 (0,001; 0,002)	0,001 (0,0008; 0,0013)	0,001 (0,0007; 0,002)	0,011** (0,009; 0,013)
C14:0	**Миристиновая** Myristic acid	0,014 (0,009; 0,0016)	0,024 (0,020; 0,028)	0,020 (0,016; 0,028)	0,010 (0,006; 0,014)
C15:0	**Пентадециловая** Pentadecyl acid	0,001 (0,0007; 0,0015)	0,001 (0,0007; 0,001)	0,002 (0,001; 0,003)	0,002 (0,001; 0,003)
C16:0	**Пальмитиновая** Palmitic acid	0,042 (0,021; 0,046)	0,033 (0,027; 0,035)	0,039 (0,021; 0,042)	0,032 (0,028; 0,04)
C17:0	**Маргариновая** Margarine acid	0,0001 (0,000; 0,0001)	0,001* (0,0005; 0,0013)	0,001 (0,0008; 0,002)	0,002 (0,001; 0,004)
C18:0	**Стеариновая** Stearic acid	0,008 (0,006; 0,009)	0,007 (0,005; 0,008)	0,010 (0,005; 0,024)	0,014 (0,011; 0,016)
C22:0	**Бегеновая** Begenovaya acid	0,001 (0,0005; 0,002)	0,002 (0,001; 0,004)	0,001 (0,0009; 0,0025)	0,001 (0,0008; 0,0012)
C23:0	**Трикоциловая** Tricocyl acid	0,001 (0,00098; 0,002)	0,001 (0,0008; 0,002)	0,002 (0,001; 0,003)	–
C24:0	**Лигноцериновая** Lignocerine	–	0,001 (0,0006; 0,002)	0,0001 (0,0001; 0,0002)	0,001* (0,0007; 0,0015)
Ненасыщенные жирные кислоты Unsaturated fatty acids		0, 053	0,077	0,072	0,077
C14:1	**Миристолеиновая** Myristolein acid	0,001 (0,0008; 0012)	0,002 (0,001; 0,004)	0,001 (0,0007; 0,002)	0,001 (0,0008; 0,002)
7-C16:1	**Цис-7-Пальмитолеиновая** Cis-7-Palmitoleic acid	0,001 (0,0009; 0,001)	0,001 (0,0008; 0,002)	0,003 (0,001; 0,004)	0,006* (0,005; 0,0068)
9-C16:1	**Цис-9-Пальмитолеиновая** Cis-9-palmitoleic acid	0,012 (0,010; 0,014)	0,010 (0,007; 0,02)	0,008 (0,006; 0,009)	0,001** (0,0007; 0,002)
7-C18:1	**Цис 7- вакценовая** Cis-7-vaccene acid	0,002 (0,0017;0,0022)	0,003 (0,001; 0,004)	0,004 (0,003; 0,0045)	–
9-C18:1	**Олеиновая** Oleic acid	0,002 (0,001; 0,0023)	0,023* (0,01; 0,031)	0,027 (0,01; 0,032)	0,055* (0,042; 0,065)
C18:1	**Элаидиновая** Elaidine acid	0,010 (0,0095; 0,012)	0,007 (0,005; 0,008)	0,008 (0,006; 0,009)	0,004 (0,001; 0,0047)
C18:2	**Линолевая** Linoleic acid	–	0,001 (0,001; 0,002)	0,001 (0,0006; 0,002)	0,004* (0,003; 0,005)
C19:1	**Цис-нонадекаен-10,13-овая** Cis-nonadecaen-10,13-ovaya acid	0,023 (0,01; 0,028)	0,029 (0,01; 0,035)	0,019 (0,007; 0,023)	0,003** (0,001; 0,005)
C19:2	**Цис,цис-нонадекадиен-10,13-овая** Cis,cis-nonadecadiene-10,13-ovaya acid	0,002 (0,001; 0,0025)	0,001 (0,0007; 0,002)	0,001 (0,0005; 0,003)	0,002 (0,001; 0,003)
Общая масса Total weight		0,1211	0,148	0,1481	0,158

Примечание. * — $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$.
Note. * — $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

ты (С24:0) (p = 0,02). При этом в 2 раза увеличилась масса цис-7-пальмитолеиновой (С 7-С16:1) и олеиновой (9-С18:1) жирных кислот (p = 0,05), в 4 раза увеличилось содержание линолевой (С18:2) кислоты (p = 0,04). При этом масса цис-нонадекаен-10,13-овой (С19:1) и цис-9-пальмитолеиновой (9-С16:1) кислот снизилась в 6 и 8 раз соответственно (p = 0,001).

После курса приема пробиотиков регистрировали достоверно значимое увеличение продукции энтерококками органических кислот. Кислотообразование у *E. faecalis* было 28,9°Т (20,2; 36,4), а увеличилось до 44,3°Т (40,1; 45,5) (p = 0,007). Среднее значение кислотообразования у *E. faecium* до курса пробиотиков составило 27,5°Т (17,7; 37,9), после 42,5°Т (40,4; 44,5) (p = 0,001).

Обсуждение

Основополагающим механизмом действия пробиотических штаммов является создание временного микробиоценоза на основе восполнения количественного уровня микросимбионтов пациента [11]. Кроме этого, пробиотические штаммы вступают в антагонистические взаимоотношения с патогенными и условно-патогенными штаммами, которые элиминируются из кишечного биотопа, нормализуют pH кишечника, активизируют мукозальный иммунитет, метаболизируют различные субстраты и нормализуют пищеварение [2, 12, 15]. Для получения клинического эффекта от пробиотиков специалистами Российской гастроэнтерологической ассоциации рекомендуется минимальная эффективная доза не менее 10^8–10^9 КОЕ [7, 9], что и послужило основой назначаемой дозировки. Так как прием пробиотического препарата осуществлялся на фоне противотуберкулезных средств, которые обладают антибактериальной активностью, то кратность применения минимальной дозы составила 2 раза в день для того, чтобы восстановить количественный уровень бифидобактерий и лактобацилл у пациентов. Для пробиотикотерапии фтизиатрических пациентов были использованы кишечнорастворимые капсулы, которые обеспечивают доставку пробиотических штаммов до кишечника. Однако по результатам микробиологических исследований у пациентов после одного курса пробиотикотерапии длительностью 21 день не происходило восстановление количественного уровня микроорганизмов рода *Bifidobacterium*. Титры *Lactobacillus* spp. достоверно повышались по сравнению с исходным уровнем, но были ниже, чем региональные значения нормы [25]. Можно предположить, что у пациентов с туберкулезом легких формируются стойкие микроэкологические нарушения кишечника, сопровождающиеся значительным снижением количественных уровней доминантных кишечных микросимбионтов и нарушением регуляторных механизмов, поэтому одного курса пробиотикотерапии недостаточно для восстановления титров микробиоты [3]. Лактобациллы и бифидобактерии обладают множеством механизмов, с помощью которых они регулируют количественный уровень других микроорганизмов [5, 12, 22]. В связи с этим под влиянием пробиотических штаммов родов *Bifidobacterium, Lactobacillus* могут восстанавливаться титры факультативно-анаэробных резидентов кишечного микробиома — типичной кишечной палочки и энтерококков [21]. У больных туберкулезом уровни *E. coli* lac+, *E. faecalis*, *E. faecium* остались низкими. Но после курса пробиотиков сократилось в 2 раза число пациентов, у которых в микробиоме регистрировали грибы рода *Candida* в диагностически значимых титрах, в 3 раза сократилось число лиц с лактозонегативными эшерихиями, то есть уменьшилась частота обнаружения условно-патогенных микроорганизмов.

Установлено, что даже один курс пробиотикотерапии оказывает положительное влияние на биологические свойства энтерококков. О роли этих микроорганизмов в кишечном микробиоме идут споры, так как их функции и свойства при эубиозе [4, 23, 18] и при микроэкологических нарушениях отличаются [6, 24]. Они могут быть продуцентами бактериоцинов, органических кислот — молочной, уксусной — с выраженным антибактериальным действием [18, 23]. Но при определенных условиях энтерококки способны проявлять вирулентность — синтезировать гемолизины, липазу, желатиназу, гиалуронидазу [10]. Они обладают свойством инактивировать низкомолекулярные биологически активные вещества организма человека [13]. По результатам исследования установлено, что несмотря на сохранение низких колонизационных уровней энтерококков изменились их биологические свойства. Достоверно снизилось число энтерококков, продуцирующих цитолизины (гемолизины), в 6 раз — желатиназу, в 2 раза — энтерококков, обладающих липазной активностью, то есть в целом уменьшились риски инвазии энтерококков через слизистую кишечника.

Под влиянием пробиотиков произошли изменения жирнокислотного состава мембраны энтерококков, от которого зависит ее физическое состояние и, соответственно, функциональные свойства [26]. Так, у *E. faecalis* достоверно увеличилось содержание ненасыщенной олеиновой кислоты. У *E. faecium* увеличилось количество олеиновой, линолевой и цис-7-пальмитолеиновой жирных кислот.

Все эти жирные кислоты придают мембране микроорганизмов пластичность и текучесть [1, 20, 26]. По данным литературы ненасыщенные кислоты в составе мембраны микроорганизмов повышают гидрофобность клеточной поверхности и увеличивают адгезивные свойства, а также поддерживают активность белков метаболизма бактерий [1, 26]. Установлено, что у энтерококков после курса пробиотикотерапии в 2 раза увеличивалась активность продукции органических кислот при ферментации глюкозы, что подтверждает литературные данные и демонстрирует качественные молекулярные изменения, произошедшие под влиянием живых бактерийных препаратов.

Заключение

Результаты исследования показали, что однократный курс пробиотикотерапии многокомпонентным пробиотиком на основе бифидобактерий и лактобацилл у пациентов с туберкулезом легких и МЛУ возбудителя не позволяет восстановить количественный уровень резидентных микросимбионтов — бифидобактерий, лактобацилл, типичных эшерихий, но в целом положительно влияет на микробиом. Происходят качественные изменения микробиоты, характеризующиеся снижением частоты колонизации и титров условно-патогенных микроорганизмов с вирулентными свойствами. Установлены молекулярные изменения мембран энтерококков, связанные с ростом массы ненасыщенных жирных кислот, придающих оболочке пластичность и функциональную активность, что сопровождается увеличением кислотообразования. Продемонстрированы механизмы воздействия пробиотических штаммов на кишечный микробиом, основанные на регуляции количественных уровней и свойств условно-патогенной микробиоты, а также их влияние на состав и активность клеточной мембраны непатогенных энтерококков. Полученные данные перспективны для проведения рандомизированных клинических исследований по определению длительности и количества курсов пробиотикотерапиии у пациентов с туберкулезом легких, с последующей оценкой влияния пробиотиков на течение основного заболевания и эффективность противотуберкулезной терапии.

Благодарности

Коллектив исследователей выражает благодарность лаборантскому составу кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО КемГМУ за техническое обеспечение микробиологических исследований.

Список литературы/References

1. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Матосова Е.В. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 6. С. 594–603. [Andriukov B.G., Lyapun I.N., Matosova E.V. The significance of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies of bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2020, vol. 97, no. 6. pp. 594–603. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-10*
2. Белкина Т.В., Аверина О.В., Савенкова Е.В., Даниленко В.Н. Микробиом кишечника человека и иммунная система: роль пробиотиков в формировании иммунобиологического потенциала, препятствующего развитию инфекции COVID-19 // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140, № 6. С. 523–539. [Belkina T.V., Averina O.V., Savenkova E.V., Danilenko V.N. Human gut microbiome and immune system: the role of probiotics in the formation of immunobiological potential that prevents the development of COVID-19 infection. *Uspekhi sovremennoi biologii = Successes of Modern Biology, 2020, vol. 140, no. 6, pp. 523–539. (In Russ.)*] *doi: 10.31857/S0042132420060034*
3. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. Оценка микробиоты и пробиотических штаммов с позиций новых научных технологий // Фарматека. 2016. № 11. С. 21–33. [Bondarenko V.M., Rybalchenko O.V. Evaluation of microbiota and probiotic strains from the standpoint of new scientific technologies. *Farmateka = Pharmateca, 2016, no. 11, pp. 21–33. (In Russ.)*]
4. Ермоленко Е.И., Абдурасулова И.Н., Котылева М.П., Свиридо Д.А., Мацулевич А.В., Карасева А.Б., Тарасова Е.А., Сизов В.В., Суворов А.Н. Влияние индигенных энтерококков на микробиоту кишечника и поведение крыс при коррекции экспериментального дисбиоза // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017. Т. 103, № 1. С. 22–37. [Ermolenko E.I., Abdurasulova I.N., Kotyleva M.P., Svirido D.A., Matsulevich A.V., Karaseva A.B., Tarasova E.A., Sizov V.V., Suvorov A.N. Influence of indigenous enterococci on intestinal microbiota and behavior of rats during correction of experimental dysbiosis. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Russian Journal of Physiology, 2017, vol. 103, no. 1, pp. 22–37. (In Russ.)*]
5. Загайнова А.В., Федец З.Е., Панькова М.Н., Новожилов К.А., Грицюк О.В., Курбатова И.В. Лактобациллы как составная часть микробиоты кишечника и их значение в физиологическом состоянии человека // Russian Journal of Environmental and Rehabilitation Medicine. 2022. № 4. С. 12–25. [Zagainova A.V., Fedets Z.E., Pankova M.N., Novozhilov K.A., Gritsyuk O.V., Kurbatova I.V. Lactobacilles as a component of the intestinal microbiota and their significance in the physiological state of humans. *Russian Journal of Environmental and Rehabilitation Medicine, 2022, no. 4, pp. 12–25. (In Russ.)*]
6. Захарова Ю.В., Отдушкина Л.Ю., Марковская А.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Леванова Л.А. Исследование in vitro механизмов взаимодействия грибов Candida albicans с Klebsiella pneumoniae и Enterococcus faecalis, выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 4. С. 420–427. [Zakharova Yu.V., Otdushkina L.Yu., Markovskaya A.A., Nesvizh Yu.V.,

Afanasyev S.S., Levanova L.A. In vitro study of mechanisms of interaction of Candida albicans fungi with Klebsiella pneumoniae and Enterococcus faecalis isolated from the intestinal microbiome of HIV-infected patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2022, vol. 99, no. 4, pp. 420–427. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-271*

7. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Абдулганиева Д.И. , Алексеенко С.А., Горелов А.В., Захарова И.Н., Зольникова О.Ю., Ивашкина Н.Ю., Корочанская Н.В., Маммаев С.Н., Полуэктова Е.А., Трухманов А.С., Усенко Д.В., Успенский Ю.П. Практические рекомендации Научного сообщества по содействию клиническому изучению микробиома человека (НСОИМ) и Российской гастроэнтерологической ассоциации (РГА) по применению пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков и обогащенных ими функциональных пищевых продуктов для лечения и профилактики заболеваний гастроэнтерологического профиля у детей и взрослых // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2021. Т. 31, № 2. С. 65–91. [Ivashkin V.T., Mayev I.V., Abdulganieva D.I., Alekseenko S.A., Gorelov A.V., Zakharova I.N., Zolnikova O.Yu., Ivashkina N.Yu., Korochanskaya N.V., Mammaev S.N., Poluektova E.A., Trukhmanov A.S., Usenko D.V., Uspensky Yu.P. Practical recommendations of the Scientific Community to promote the clinical study of the human microbiome (NSOIM) and the Russian Gastroenterological Associations (RGA) on the use of probiotics, prebiotics, synbiotics and functional foods enriched with them for the treatment and prevention of gastroenterological diseases in children and adults. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology, 2021, vol. 31, no. 2, pp. 65–91. (In Russ.)] doi: 10.22416/1382-4376-2021-31-2-65-91*
8. Казюлин А.Н., Гончаренко А.Ю., Калягин Е.И. Эволюция терапии пробиотиками в клинике внутренних болезней // Русский медицинский журнал. 2019. № 12. С. 89–96. [Kazyulin A.N., Goncharenko A.Yu., Kalyagin E.I. Evolution of probiotic therapy in the clinic of internal diseases. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal, 2019, no. 12, pp. 89–96. (In Russ.)]*
9. Кайбышева О.В., Никонов Е.Л. Пробиотики с позиции доказательной медицины // Доказательная гастроэнтерология. 2019. Т. 8, № 3. С. 45–54. [Kaibysheva O.V., Nikonov E.L. Probiotics from the standpoint of evidence-based medicine. *Dokazatel'naya gastroenterologiya = Evidence-based Gastroenterology, 2019, vol. 8, no. 3, pp. 45–54. (In Russ.)] doi: 10.17116/dokgastro2019803145*
10. Коменкова Т.С., Зайцева Е.А. Фенотипическое и генотипическое разнообразие Enterococcus faecalis при инфекционно-воспалительных заболеваниях мочевой системы у детей в Приморском крае // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2020. Т. 81, № 2. С. 4–12. [Komenkova T.S., Zaitseva E.A. Phenotypic and genotypic diversity of Enterococcus faecalis in infectious and inflammatory diseases of the urinary system in children in Primorsky Krai. Zdorov'e. *Meditsinskaya ekologiya. Nauka = Health. Medical Ecology. The Science, 2020, vol. 81, no. 2, pp. 4–12. (In Russ.)] doi: 10.5281/zenodo.4000324*
11. Машарова А.А., Данилевская Н.Н. Современные критерии выбора эффективной пробиотикотерапии // Медицинский совет. 2018. № 12. С. 52–59. Masharova A.A., Danilevskaya N.N. Modern criteria for choosing effective probiotic therapy. *Meditsinskiy sovet = Medical Council, 2018, no. 12, pp. 52–59. (In Russ.)] doi: 10.21518/2079-701X-2018-12-52-59*
12. Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Лазарев С.А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека — основа создания нового поколения пробиотических препаратов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 4. С. 346–355. [Mikhailova N.A., Voevodin D.A., Lazarev S.A. Modern ideas about pro-/eukaryotic interactions of the human body – the basis for creating a new generation of probiotic drugs. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2020, vol. 97, no. 4, pp. 346–355. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-4-7*
13. Пашкова Т.М. Характеристика антицитокиновой активности Enterococcus spp., изолированных от животных // Вестник Оренбургского государственного университета. 2017. Т. 209, № 9. С. 82–84. [Pashkova T.M. Characteristics of the anti-cytokine activity of Enterococcus spp. isolated from animals. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State University, 2017, vol. 209, no. 9, pp. 82–84. (In Russ.)]*
14. Родина О.В., Борисов С.Е., Иванова Д.А. Нежелательные реакции при различных режимах химиотерапии больных туберкулезом органов дыхания // Туберкулез и социально значимые заболевания. 2020. № 2. С. 44–54. [Rodina O.V., Borisov S.E., Ivanova D.A. Adverse events of the new and traditional chemotherapy regimens in the patients with multi drug resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolevaniya = Tuberculosis and Socially Significant Diseases, 2020, vol. 2, pp. 44–54. (In Russ.)]*
15. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Королькова Е.Д., Фонтуренко А.Ю., Капустина В.В., Вишневская О.Н., Кошевая Е.Г. Гистологические исследования слизистой оболочки тонкой кишки крысы при воздействии эндотоксина и пробиотических бактерий // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2018. № 2. С. 32–36. [Rybalchenko O.V., Orlova O.G., Korolkova E.D., Fonturenko A.Yu., Kapustina V.V., Vishnevskaya O.N., Koshevaya E.G. Histological studies of the rat small intestine mucosa under the influence of endotoxin and probiotic bacteria. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga = Gastroenterology of St. Petersburg, 2018, no. 2, pp. 32–36. (In Russ.)]*
16. Соловьева И.В., Белова И.В., Точилина А.Г., Барболина С.Ф., Иванова Т.П., Жирнов В.А. Микробиота толстой кишки больных с туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью // Медицинский академический журнал. 2017. Т. 17, № 4. С. 71–73. [Solovyova I.V., Belova I.V., Tochilina A.G., Barbolina S.F., Ivanova T.P., Zhirnov V.A. Microbiota of the colon of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal, 2017, vol. 17, no. 4, pp. 71–73. (In Russ.)]*
17. Суворов А.Н. Микробная персонифицированная терапия как новый инструмент лечащего врача // Российский журнал персонализованной медицины. 2022. Т. 2, № 1. С. 51–62. Suvorov A.N. Microbial personalized therapy as a new instrument of the attending physician. *Rossiiskii zhurnal personalizovannoi meditsiny = Russian Journal of Personalized Medicine, 2022, vol. 2, no. 1, pp. 51–62. (In Russ.)] doi: 10.18705/2782-3806-2022-2-1-51-62*
18. Сычева М.В. Биологические свойства энтерококков, выделенных из организма животных и человека: фенотипическая характеристика и генетический контроль // Шаг в науку. 2021. № 2. С. 4–9. [Sycheva M.V. Biological properties of enterococci isolated from animals and humans: phenotypic characteristics and genetic control. *Shag v nauku = Step into Science, 2021, no. 2, pp. 4–9. (In Russ.)]*

19. Туберкулез у взрослых. Клинические рекомендации. М.: 2022. 151 с. [Tuberculosis in adults. Clinical recommendations. *Moscow: 2022. 151 p. (In Russ.)*]
20. Шипко Е.С., Дуванова О.В. Влияние температурного стресса на спектр жирных кислот штаммов Vibrio cholerae // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». 2022. № 2. С. 143–154. [Shipko E.S., Duvanova O.V. Influence of temperature stress on the spectrum of fatty acids of Vibrio cholerae strains. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya "Biologiya" = Bulletin of Perm University. Biology Series, 2022, no. 2, pp. 143–154. (In Russ.)] doi: 10.17072/1994-9952-2022-2-143-154*
21. Abdelghani Z., Hourani N., Zaidan Z., Dbaibo G., Mrad M., Hage-Sleiman R. Therapeutic applications and biological activities of bacterial bioactive extracts. *Arch. Microbiol., 2021, vol. 203, pp. 4755–4776. doi: 10.1007/s00203-021-02505-1*
22. Derrien M., Turroni F., Ventura M., Sinderen D.V. Insights into endogenous Bifidobacterium species in the human gut microbiota during adulthood. *Trends Microbiol., 2022, vol. 30, no. 10, pp. 940–947. doi: 10.1016/j.tim.2022.04.004*
23. Du R., Ping W., Ge J. Purification, characterization and mechanism of action of enterocin HDX-2, a novel class II a bacteriocin produced by Enterococcus faecium HDX-2. *LWT — Food Science and Technology, 2022, vol. 153: 112451 doi: 10.1016/j.lwt.2021.112451*
24. Jung A., Metzner M., Ryll M. Comparison of pathogenic and non-pathogenic Enterococcus cecorum strains from different animal species. *BMC Microbiol., 2017, vol. 17, pp. 33–46. doi: 10.1186/s12866-017-0949-y*
25. Levanova L.A., Aleshkin V.A., Vorob'ev A.A., Afanas'ev S.S., Zinin-Bernes N.N., Rubal'skiĭ O.V., Aleshkin A.V. Age-dependent characteristics of intestinal microbiocenosis in Kemerovo residents. *Journal of Microbiology, Epidemiology Immunobiology, 2001. vol. 3, pp. 72–77.*
26. Sukhikh A., Zakharova Yu., Yuzhalin A., Bykov A., Kotova T., Poznyakovskiy V. Criteria for standardization of probiotic components in functional food products. *Foods and Raw Materials, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 457–466. doi: 10.21603/2308-4057-2018-2-457-466*
27. Ueckermann V., Lebre P., Geldenhuys J., Hoosien E., Cowan D., Rensburg L.J., Ehlers M. The lung microbiome in HIV-positive patients with active pulmonary tuberculosis. *Scientifc Reports, 2022, no. 12: 8975. doi: 10.1038/s41598-022-12970-3*

Авторы:
Отдушкина Л.Ю., ассистент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;
Захарова Ю.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;
Холодов А.А., клинический ординатор кафедры фтизиатрии 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:
Otdushkina L.Yu., Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation;
Zakharova Yu.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation;
Kholodov A.A., Resident Physician, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation;
Pyanzova T.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.02.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 27.02.2023
Accepted 21.06.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 526–534

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 526–534

ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУЧАЕВ ОСТРОЙ ДИАРЕИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ, В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ КОТОРЫХ ВЫЯВЛЕН *CAMPYLOBACTER* spp.

Е.А. Кожухова[1], Н.В. Андреева[2], М.И. Дмитриева[2], С.Л. Николаенко[1]

[1] *ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *СПб ФГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. В последние годы в нашей стране, как и в различных других странах и регионах, имеет место отчетливая тенденция к увеличению частоты регистрации инфекции, вызванной *Campylobacter* spp. Отчасти это связано с внедрением в рутинную лабораторно-диагностическую практику молекулярно-биологических методов исследования, что значительно облегчило выявление маркеров *Campylobacter* spp. в клиническом материале пациентов. Вариабельность клинических проявлений кампилобактериоза, который может протекать как в локализованной, так и в генерализованной формах, предположительная триггерная роль перенесенной инфекции в последующем формировании и развитии хронической патологии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также неинфекционной системной патологии, делает проблему изучения инфицированности *Campylobacter* spp. достаточно актуальной. В клинической картине острой диареи, вызванной *Campylobacter* spp., развитие синдрома колита, в том числе с проявлениями гемоколита, в определенной степени коррелирует с тяжестью заболевания. В связи с этим у пациентов с острой диареей при положительной реакции клинического материала на *Campylobacter* spp. представляют интерес клинико-лабораторные сопоставления и поиск возможных ассоциаций с вариантами течения заболевания. Цель исследования — проанализировать клинико-лабораторные характеристики госпитализированных взрослых больных острой диареей, в клиническом материале которых (фекалиях) выявлен *Campylobacter* spp. При проведении ретроспективного когортного исследования анализировали клинико-лабораторные данные 111 госпитализированных взрослых больных острой кишечной инфекцией средней тяжести, в клиническом материале которых (фекалиях) выявляли маркер возбудителя кампилобактериозной инфекции. Для верификации острой инфекционной диареи комплексное специфическое лабораторное обследование наряду с классическими стандартными методами (культуральный, серологический, на основе определения в сыворотке крови специфических антител в диагностическом титре или при его 4-кратном приросте, иммуноферментный) включало исследование фекалий пациента методом ПЦР с использованием набора «Амплисенс® ОКИ скрин-FL» (Интерлабсервис, Россия). Анализ результатов обследования показал, что проявления синдрома дистального колита имели место более, чем у половины пациентов, в том числе гемоколита — почти у каждого четвертого больного обследованной когорты. У пациентов преимущественно мужского пола без фоновой сопутствующей хронической патологии ЖКТ относительный риск развития проявлений дистального колита увеличивался в 1,6 раза, а гемоколита — в 2,6 раза, при поступлении в стационар на 4 день болезни и позднее.

Ключевые слова: *острая диарея, Campylobacter spp., ПЦР, колит, гемоколит, день болезни на момент госпитализации.*

Адрес для переписки:
Кожухова Елена Алексеевна
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.
Тел./факс: 8 (812) 338-70-58, 234-47-98; 8 (905) 221-05-98 (моб.).
E-mail: elko35@gmail.com

Contacts:
Elena A. Kozhukhova
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L'va Tolstogo str., 6/8, Pavlov First St. Petersburg State Medical University.
Phone/fax: +7 (812) 338-70-58, 234-47-98; +7 (905) 221-05-98 (mobile).
E-mail: elko35@gmail.com

Для цитирования:
Кожухова Е.А., Андреева Н.В., Дмитриева М.И., Николаенко С.Л. Характеристика случаев острой диареи у взрослых больных, в клиническом материале которых выявлен Campylobacter spp. // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 526–534. doi: 10.15789/2220-7619-COA-1886

Citation:
Kozhukhova E.A., Andreeva N.V., Dmitrieva M.I., Nikolaenko S.L. Characteristics of acute diarrhea in adult cases with Campylobacter spp. positive fecal samples // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 526–534. doi: 10.15789/2220-7619-COA-1886

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-COA-1886

CHARACTERISTICS OF ACUTE DIARRHEA IN ADULT CASES WITH *CAMPYLOBACTER* spp. POSITIVE FECAL SAMPLES

Kozhukhova E.A.[a], Andreeva N.V.[b], Dmitrieva M.I.[b], Nikolaenko S.L.[a]

[a] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

[b] *Hospital named after S.P. Botkin for Infectious Diseases in Adults, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Recently, cases caused by *Campylobacter* spp. in Russia similar to other countries tended to clearly rise, partly due to the widely implemented biomolecular PCR-based laboratory analysis that substantially facilitated *Campylobacter* spp. detection in patient's samples. The problem of being infected by *Campylobacter* spp. is so far worth studying because of campilbacteriosis signs in a form of a variety of clinical patterns including local and general forms, possible trigger role in forming the consequent chronic digestive tract pathology as well as general systemic pathology. Development of colitis or heamocolitis as the pattern part of acute diarrhea caused by *Campylobacter* spp. is usually considered as associated with the disease burden. So far as adult patients have acute diarrhea with positive *Campylobacter* spp. samples it might be of interest to compare and analyze their clinical and laboratory data to find some possible associations as particular features of different disease patterns. Objective — to analyze clinical features and laboratory data of hospitalized AD adult cases with feces samples positive for *Campylobacter* spp. When carrying out the retrospective cohort study the analyzed were clinical and laboratory data of 111 hospitalized adult patients suffering from moderate acute diarrhea with clinical samples (feces) positive for *Campylobacter* spp. To verify acute infectious diarrhea all patients went through complex specific laboratory examination that included PCR — based methods (feces) with use of "Amplisense® AD screen-FL" in addition to routine standard culture (feces), serologic (specific antibody detection) and ELISA laboratory methods. The analysis results have shown that more than 1/2 part of patients developed colitis syndrome with blood in feces in practically every forth case. In patients (predominantly males) without chronic digestive tract problems relative risks to develop colitis and haemocolitis are respectively 1.6 and 2.6 times higher given they are hospitalized on day 4 after the onset and later versus those hospitalized earlier.

Key words: *acute diarrhea, Campylobacter spp., PCR, colitis, haemocolitis, disease day at the moment of hospital admission.*

Введение

Современная структура острых диарей (ОД) формируется благодаря их верификации самыми различными лабораторными методами, включая молекулярно-биологические, которые существенно расширили возможности выявления как вирусных, так и бактериальных энтеропатогенов [10]. В отношении проблемы кампилобактериоза применение таких методов позволило вывести изучение *Campylobacter* spp. на качественно новый уровень. В дополнение к трудоемкому и достаточно длительному процессу выделения возбудителя культуральным методом появилась возможность в короткие сроки детектировать его генетические маркеры [12, 13, 22], анализировать симптоматику заболевания в сопоставлении с его генетически детерминированными характеристиками [14, 16, 19], выявлять мутации резистентности к используемым для лечения пациентов антимикробным препаратам (АМП) [15].

С другой стороны, внедрение дополнительных, некультуральных, методов выявления *Campylobacter* spp. в рутинную практику закономерно привело к существенному росту регистрации кампилобактериоза и увеличению его доли в общей структуре острых кишечных инфекций (ОКИ), в том числе в Санкт-Петербурге [8].

К особенностям кампилобактериозной инфекции в настоящее время относят достаточно широкую распространенность, вариабельность клинических проявлений с симптоматикой различных локализованных форм и возможностью генерализации патологического процесса [27, 29], особенно у иммунокомпромитированных пациентов [9, 21]. Обсуждается предположительная триггерная роль перенесенной кампилобактериозной инфекции в последующем формировании и развитии хронической патологии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [23, 24], а также неинфекционной системной патологии [17, 18, 25].

Сценарий развития течения инфекции в определенной степени зависит как от состояния восприимчивого к ней организма, так и от морфофункциональных и генетических характеристик представителей *Campylobacter* spp. [6, 20, 30]. Так, например, доказано, что *Campylobacter jejuni* относится к бактериям — продуцентам так называемого CDT токсина, способного подавлять как клеточный, так и гуморальный иммунитет, и как следствие способствовать персистенции микроба и пролонгированному течению заболевания [26].

С другой стороны, современными лабораторными методами исследования в клиническом материале больных ОКИ нередко обнаруживают маркеры различных энтеропатогенов одновременно [3, 7], что закономерно вызывает затруднения в оценке их этиологической роли, тяжести течения заболевания и, соответственно, в выборе терапевтической и противоэпидемической тактики.

Цель исследования — проанализировать клинико-лабораторные характеристики госпитализированных взрослых больных ОД, в клиническом материале которых выявлен *Campylobacter* spp.

Материалы и методы

Было проведено ретроспективное когортное исследование, в ходе которого выполнен анализ результатов клинико-лабораторного обследования 111 госпитализированных взрослых больных, в клиническом материале которых (фекалиях) выявляли *Campylobacter* spp. В стационар все пациенты поступали с ОД средней тяжести. Для верификации диагноза в рамках специфического лабораторного обследования клинического материала всех пациентов применяли: культуральный метод — для выявления *Salmonella* spp. (с использованием сред обогащения), *Shigella* spp., *E. coli* spp.; серологический метод (на основе определения специфических антител в диагностическом титре или при его 4-кратном приросте) — для выявления факта инфицированности *Salmonella* spp., *Shigella* spp.; иммуноферментный метод — для выявления антигенов рота- и аденовирусов, а также ПЦР-метод с использованием набора «Амплисенс® ОКИ скрин-FL» (Интерлабсервис, Россия) — для выявления в фекалиях пациентов генетических маркеров *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* spp., рота-, астро-, аденовирусов и вирусов Norwolk.

Анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программ SAS. Частотные характеристики сравнивали с использованием таблиц сопряженности, критерия независимости хи-квадрат и точного критерия Фишера. Оценивали относительные риски с учетом значений доверительных интервалов. Критический уровень значимости p при проведении исследования считали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Возраст подавляющего большинства больных (90,1%, n = 111) в когорте обследованных пациентов не превышал 59 лет. По гендерному признаку преобладали мужчины (64,9%, n = 111). На наличие хронической сопутствующей неинфекционной патологии указали чуть более половины (56,8%) больных, в том числе хронической патологии ЖКТ вне обострения (язвенная болезнь желудка, двенадцатиперстной кишки, хронический гастрит, хронический холецистопанкреатит, дискинезия желчевыводящих путей) — 33,3% (n = 111) пациентов. В стационар больные поступали в среднем на 3±0,20 (M±m) день болезни (n = 107). Большинство пациентов (70%) поступили на 1–3 дни заболевания, чуть менее одной трети пациентов (30%) — на 4 день болезни и позднее.

На факт приема различных АМП на догоспитальном этапе, в том числе в качестве «самолечения», указали 16,4% пациентов (n = 110). При этом, вероятно, следует считать закономерным, что среди лиц, поступивших на поздних сроках заболевания, факт приема АМП имел место значительно чаще, чем у госпитализированных в 1–3 дни заболевания (табл. 1).

Известно, что для клинической картины ОД, вызванной *Campylobacter* spp., считается достаточно характерным развитие синдрома колита, в том числе с проявлениями гемоколита, что в определенной степени коррелирует с тяжестью заболевания [28].

В нашем исследовании анализ клинической симптоматики показал, что синдром дистального колита, документированный по изменениям в копроцитограмме и/или по результатам ректороманоскопии, имел место более, чем у половины больных (58±4,8%), в том числе гемоколита — почти у каждого четвертого пациента (23±4,0%) (n = 111).

При более детальном анализе выявили, что в группе пациентов с сопутствующей хронической патологией ЖКТ проявления дистального колита констатировали одинаково часто, как у лиц, госпитализированных в ранние, так и в поздние сроки заболевания, тогда как в группе больных без фоновой хронической патологии ЖКТ у пациентов, поступивших в стационар на 4 день болезни и позднее, синдром дистального колита документировали значительно чаще, чем у тех, кто поступал на более ранних сроках заболевания (73,1 и 45,7% соответственно, ОР 1,6; ДИ: 1,1–2,4; табл. 2).

Относительный риск развития синдрома гемоколита как клинического индикатора более неблагоприятного развития событий оказался в 2,4 раза выше (ОР 2,4, ДИ 1,2–4,8) у лиц, поступавших в стационар на поздних сроках ОД. Проявления гемоколита в этой группе больных диагностировали значительно чаще, чем у поступивших в первые 3 дня заболевания (табл. 3).

Известно, что при ОКИ эмпирическое использование АМП, в том числе в качестве «самолечения», может приводить к нежелательным явлениям, например, к более длительному выделению энтеропатогена в окружающую среду [4].

Прицельный анализ позволил выявить, что именно в группе пациентов без хронической патологии ЖКТ, среди тех, кто поступал на 4 день болезни и позднее, было значительно больше лиц, использовавших АМП на догоспитальном этапе (табл. 4).

Таблица 1. Доля пациентов, принимавших на догоспитальном этапе АМП, в группах лиц, госпитализированных на разных сроках заболевания (n = 106*)

Table1. Percentage of patients having taken antimicrobials before hospital admittance in groups of people matched by disease day at the moment of hospitalization (n = 106*)

День болезни на момент госпитализации Disease day at hospitalization	**Показатель** Index	**Прием АМП на догоспитальном этапе** Administered antimicrobials before admission		
		Да Yes	**Нет** No	**Всего** Total
4 день болезни и позднее The 4th disease day and later	N	10	27	37
	%	27,0	73,0	100,0
1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	6	63	69
	%	8,7	91,3	100,0
Всего Total	N	16	90	106
	%	15,1	84,9	100,0
p = 0,02				

Примечание. *— нет данных у 5 пациентов.
Note. * — 5 patients have no data.

Значимой статистической ассоциации наличия/отсутствия использования АМП на догоспитальном этапе и наличия колита и гемоколита во всей исследуемой когорте выявить не удалось.

Однако стратификация исследуемой когорты по гендерному признаку позволила уточнить, что среди пациентов, поступавших в стационар на поздних сроках заболевания, именно лица мужского пола на догоспитальном этапе значительно чаще принимали АМП, и одновременно именно в этой группе существенно чаще документировали проявления гемоколита (табл. 5).

Дальнейший прицельный анализ показал, что только в группе пациентов без сопутствующей патологии ЖКТ гемоколит документировали в 2,6 раза чаще при госпитализации на поздних сроках ОД (на 4 день болезни и позднее), чем у лиц, поступавших в стационар на 1–3 день болезни (p = 0,04, ОР 2,6, ДИ: 1,1–6,1), тогда как в группе пациентов с сопутствующей хроничес-

Таблица 2. Частота выявления симптомов дистального колита в группах больных, госпитализированных в разные сроки заболевания, с учетом наличия хронической патологии ЖКТ (n = 105*)

Table 2. Percentage of patients with developed colitis syndrome in groups of people matched by availability of concomitant chronic digestive tract problems and by acute diarrhea disease day at the moment of hospitalization (n = 105*)

Сопутствующая хроническая патология ЖКТ Concomitant chronic digestive tract problem	**Сроки заболевания на момент госпитализации** Disease day at hospitalization	**Показатель** Index	**Проявления дистального колита** Colitis syndrome		
			Есть Present	**Нет** Not present	**Всего** Total
Есть Available	**На 4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	6	5	11
		%	54,5	45,5	100,0
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	14	8	22
		%	63,6	36,4	100,0
	Всего Total	N	20	13	33
		%	60,6	39,4	100,0
p > 0,05					
Нет Not available	**На 4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	19	7	26
		%	73,1	26,9	100,0
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	21	25	46
		%	45,7	54,3	100,0
	Всего Total	N	40	32	72
		%	55,6	44,4	100,0
p = 0,029					

Примечание.* — нет данных у 6 пациентов.
Note. * — 6 patients have no data.

Таблица 3. Частота выявления симптомов гемоколита в группах больных, госпитализированных в разные сроки заболевания (n = 107*)

Table3. Percentage of patients having developed bloody stool in groups of people matched by disease day *at hospitalization (n = 107*)*

Сроки заболевания на момент госпитализации Disease day at the moment of hospitalization	**Показатель** Index	**Наличие гемоколита** Bloody stool		
		Есть Available	**Нет** Not available	**Всего** Total
На 4 день болезни и позднее The 4th disease day and later	N	14	23	37
	%	37,8	62,2	100,0
1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	11	59	70
	%	15,7	84,3	100,0
Всего Total	N	25	82	107
	%	23,4	76,6	100,0
p = 0,016				

Примечание. * — нет данных у 4 пациентов.
Note. * — 4 patients have no data.

кой патологией ЖКТ не выявили статистической ассоциации частоты развития гемоколита со сроками заболевания на момент госпитализации (p = 0,39) (табл. 6).

Полученные данные позволяют предположить, что у пациентов без хронической патологии ЖКТ одним из факторов риска развития колита и гемоколита является позднее поступление в стационар. Напротив, у лиц с хронической патологией ЖКТ при ранней госпитализации с той же частотой, что и при позднем поступлении в стационар, имеют место проявления колита и гемоколита, патогенез которых, возможно, является результатом совокупных проявлений кампилобатериоза и фоновой хронической патологии.

Результаты исследования в целом не противоречат суждению о том, что у взрослых пациентов, страдающих различной фоновой хронической патологией ЖКТ, симптоматика ОД,

Таблица 4. Доля пациентов, принимавших АМП на догоспитальном этапе, в группах лиц с наличием и отсутствием сопутствующей патологии ЖКТ с учетом сроков заболевания на момент госпитализации (n = 106*)

Table 4. The percentage of patients having taken antimicrobials before hospital admittance in groups of people matched by availability of concomitant chronic digestive tract problems and by the disease day at hospitalization (n = 106*)

Наличие сопутствующей хронической патологии ЖКТ Concomitant chronic digestive tract problems	**Сроки заболевания на момент госпитализации** Disease day at the moment of hospitalization	**Показатель** Index	**Использование АМП на догоспитальном этапе** Usage of antimicrobials before hospital admission		
			Да Yes	**Нет** No	**Всего** Total
Есть Available	**На 4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	3	8	11
		%	27,3	72,7	100,0
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	2	19	21
		%	9,5	90,5	100,0
	Всего Total	N	5	27	32
		%	15,6	84,4	100,0
p > 0,05					
Нет Not available	**На 4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	7	19	26
		%	26,9	73,1	100,0
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	4	44	48
		%	8,3	91,7	100,0
	Всего Total	N	11	63	74
		%	14,9	85,1	100,0
p = 0,043					

Примечание. * — нет данных у 5 пациентов.
Note. * — 5 patients have no data.

вызванной любым энтеропатогеном, может приобретать отличные от классического течения моноинфекции характеристики [2].

Таким образом, полученные статистические данные у обследованных нами больных иллюстрируют ассоциацию определенного паттерна взрослого пациента (мужской пол, без сопутствующей хронической патологии ЖКТ, позднее поступление в стационар и эмпирическое применение АМП на догоспитальном этапе, в том числе в качестве «самолечения») с вариантом клинической манифестации ОД,

Таблица 5. Доля пациентов, принимавших АМП на догоспитальном этапе (n = 106*), и лиц с диагностированным гемоколитом (n = 107) в группах больных, госпитализированных на разных сроках заболевания с учетом гендерного признака**

Table 5. The percentage of patients having taken antimicrobials before hospital admittance (n = 106*) and patients with bloody stool (n = 107**) in groups of people matched by gender and by the disease day at hospitalization

Пол Gender	**Сроки заболевания на момент госпитализации** Disease day at the moment of hospitalization	**Показатель** Index	**Использование АМП на догоспитальном этапе** Usage of antimicrobials before hospital admittance			p	**Наличие гемоколита** Bloody stool			p
			Да	**Нет**	**Всего**		**Есть**	**Нет**	**Всего**	
Женщины Female	**На 4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	3	12	15	> 0,05	5	10	15	> 0,05
		%	20,0	80,0	100,0		33,3	66,7	100,0	
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	3	19	22		4	18	22	
		%	13,6	86,4	100,0		18,2	81,8	100,0	
	Всего Total	N	6	31	37		9	28	37	
		%	16,2	83,8	100,0		24,3	75,7	100,0	
Мужчины Male	**На 4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	7	15	22	0,009	9	13	22	0,029
		%	31,8	68,2	100,0		40,9	59,1	100,0	
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	3	44	47		7	41	48	
		%	6,4	93,6	100,0		14,6	85,4	100,0	
	Всего Total	N	10	59	69		16	54	70	
		%	14,5	85,5	100,0		22,9	77,1	100,0	

Примечание. * — нет данных у 5 пациентов; ** — нет данных у 4 пациентов.
Note. * — 5 patients have no data; ** — 4 patients have no data.

Таблица 6. Частота выявления гемоколита в группах больных с наличием и отсутствием хронической патологии ЖКТ с учетом срока заболевания на момент госпитализации (n = 107*)

Table 6. Percentage of patients having developed bloody diarrhea in groups of people matched by chronic digestive tract problems availability and disease day at the hospitalization date (n = 107*)

Наличие сопутствующей хронической патологии ЖКТ Concomitant chronic digestive tract problems	**Сроки заболевания на момент госпитализации** Disease day at hospitalization	**Показатель** Index	**Наличие гемоколита** Bloody stool		
			Есть Yes	**Нет** No	**Всего** Total
Есть Available	**4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	4	7	11
		%	36,4	63,6	100,0
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	4	18	22
		%	18,2	81,8	100,0
	Всего Total	N	8	25	33
		%	24,2	75,8	100,0
p > 0,05					
Нет Not available	**4 день болезни и позднее** The 4th disease day and later	N	10	16	26
		%	38,5	61,5	100,0
	1–3 день болезни The 1st–3rd disease day	N	7	41	48
		%	14,6	85,4	100,0
	Всего Total	N	17	57	74
		%	23,0	77,0	100,0
p = 0,04					

Примечание. * — нет данных у 4 пациентов.
Note. * — 4 patients have no data.

сопровождающимся развитием колитического синдрома. С определенной долей осторожности можно предположить возможную триггерную роль догоспитального использования АМП в развитии синдрома гемоколита у пациентов (преимущественно мужского пола) без сопутствующей хронической патологии ЖКТ при условии позднего поступления в стационар. Полученные нами результаты находятся в соответствии с имеющимися в литературе представлениями о возможной триггерной роли использования терапевтических препаратов, в том числе антибиотиков, в развитии различных вариантов течения и последствий ОД, вызванных *Campylobacter* [11].

Результаты детекции энтеропатогенов всеми использованными в нашем исследовании специфическими лабораторными методами в ряде случаев показали наличие маркеров одновременно нескольких возбудителей, что не противоречит данным других исследователей [5]. Так, у 17 больных (15,9%) наряду с *Campylobacter* spp. выявляли ротавирус, у 5,6% пациентов (6 человек) — *Shigella* spp., в том числе культуральным методом у одного пациента (0,9%). У 3,7% пациентов (4 человека) наряду с *Campylobacter* spp. выявляли *Salmonella* spp., в том числе культуральным методом у 3 больных (2,8%) (n = 111). При этом при сравнении доли пациентов с синдромом гемоколита в группе лиц с позитивной реакцией клинического материала одновременно на *Campylobacter* spp. и другие инвазивные бактериальные энтеропатогены (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* spp.) и у тех, у кого детектировали только *Campylobacter* spp., значимой разницы не выявили.

Представляется, однако, что клинико-лабораторные сопоставления у больных ОД с позитивной реакцией клинического материала одновременно к нескольким энтеропатогенам должны привлекать дополнительный перспективный интерес. Так, например, уже показано, что возможны очень тяжелые варианты клинического течения микст кишечной инфекции [5], а при бактериально-вирусных ассоциациях последние могут влиять на внутриклеточную бактерицидность лейкоцитов и удлинять у пациентов период бактериовыделения [1], что имеет и несомненное эпидемиологическое значение.

Выводы

У взрослых больных ОД с позитивной реакцией клинического материала на *Campylobacter* spp.:

- более, чем у половины пациентов (58±4,8%) имеют место проявления синдрома дистального колита, в том числе гемоколита — в 23±4,0% случаев;
- при отсутствии сопутствующей патологии ЖКТ своевременная госпитализация снижает риск развития дистального колита в 1,6 раза (p = 0,03, ОР 1,6, ДИ: 1,1–2,4), гемоколита — в 2,6 раза (p = 0,04, ОР 2,6, ДИ: 1,1–6,1);
- в группе пациентов с сопутствующей хронической патологией ЖКТ наличие проявлений синдрома колита статистически не ассоциировано со сроками заболевания на момент госпитализации (p > 0,05).

Список литературы/References

1. Голубев А.О., Милютина Л.Н. Особенности иммунного статуса у детей с моно- и микст-сальмонеллезами // Инфекционные болезни. 2013. Т. 11, № 1. С. 56–60. [Golubev A.O., Milyutina L.N. Specificities of the immune status in children with salmonella mono and mixed infection. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 56–60. (In Russ.)*]
2. Епифанцева Н.В., Витковский Ю.А. Влияние полиморфизма гена G1082AIL-10 на течение острых кишечных инфекций // Медицинский вестник Башкортостана. 2022. Т. 17, № 2 (98). С. 35–39. [Epifantseva N.V., Vitkovsky Yu.A. Influence of G1082A IL-10 gene polymorphism on the course of F acute intestinal infections. *Meditsinskii vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal, 2022, vol. 17, no. 2 (98), pp. 35–39. (In Russ.)*]
3. Кожухова Е.А., Андреева Н.В., Иващенко В.Д. Этапный анализ результатов выявления возбудителей острых диарей для верификации диагноза у взрослых пациентов // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 379–383. [Kozhukhova E.A., Andreeva N.V., Ivaschenko V.D. Open ended results of acute diarrhea agent detection to verify diagnosis in adult cases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 379–383. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-379-383*
4. Лобзин Ю.В., Огарков П.И., Сиволодский Е.П., Корольков В.Ф., Речкин В.И., Семещенко И.Е., Финогеев Ю.П., Захаренко С.М., Винакмен Ю.А. Дизентерия и другие острые кишечные диарейные инфекции // Указания по диагностике, лечению и профилактике в ВС РФ. М., 2000. 197 с. [Lobzin Yu.V., Ogarkov P.I., Sivolodsky E.P., Korol'kov V.F., Rechkin V.I., Semeschenko I.E., Finogheev Yu.P., Zakharenko S.M., Vinakmen Yu.A. Dysentery and other acute diarrheal intestinal infections. Guidelines on diagnostics, treatment and prevention in MF of RF. *Moscow, 2000. 197 p. (In Russ.)*]
5. Подколзин А.Т., Кожахметова Т.А., Кясова Д.Х., Далелова З.Х., Кулешов К.В., Гусева А.Н., Павлова А.С., Веселова О.А., Паркина Н.В., Коновалова Т.А., Яцышина С.Б. Ассоциация возбудителей инфекционных диарей с летальными исходами у детей дошкольного возраста // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 752–762. [Podkolzin A.T., Kozhakhmetova T.A., Kyasova D.Kh., Dalelova Z.Kh., Kuleshov K.V., Guseva A.N., Pavlova A.S., Veselova O.A., Parkina N.V., Konovalova T.A., Yatsyshina S.B. A relationship between causative agents of infectious diarrhea and fatal outcomes in preschool children. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 752–762. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-ARB-1515*

6. Семена А.В., Малышев В.В., Финогеев Ю.П., Мясников И.О., Макаров Д.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика вспышки острых кишечных диарейных инфекций // Журнал инфектологии. 2009. Т. 1, № 2, 3. С. 48–51. [Semena A.V., Malyshev V.V., Finogeev U.P., Myasnikov I.O., Makarov D.A. Clinical and epidemiological characteristics of outbreaks of acute intestinal diarrheal infections. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2009, vol. 1, no. 2, 3, pp. 48–51. (In Russ.)*] *doi:10.22625/2072-6732-2009-1-2,3-48-51*
7. Сергеева А.В., Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Благонравова А.С., Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А. Молекулярно-генетический мониторинг острых кишечных инфекций вирусной этиологии в детском многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 243–252. [Sergeeva A.V., Poslova L.Y., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Epifanova N.V., Sashina T.A., Morozova O.V., Novikova N.A. Viral etiology acute intestinal infections molecular monitoring in children's hospital. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 243–252. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-243-252*
8. Яковлев А.А., Мусатов В.Б., Котлярова С.И., Неверов В.А., Кинго З.Н., Федуняк И.П., Лукашевич Э.Н. Возможности высокотехнологичной идентификации возбудителей острых кишечных инфекций в Санкт-Петербурге // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. 2010. Т. 2, № 3. С. 2–6. [Yakovlev A.A., Musatov V.B., Kotlyarova S.I., Neverov V.A., Kingo Z.N., Fedunyak I.P., Lukashevich E.N. Features high-tech identification of pathogens acute intestinal infections at St. Petersburg. *Vestnik Sankt-Peterburgskoi meditsinskoi akademii posledipломnogo obrazovaniya = Bulletin of Saint-Petersburg Medical Academy for Postgraduate Education, 2010, no. 3, pp. 2–6. (In Russ.)*]
9. Dumic I., Sengodan M., Franson J.J., Zea D., Ramanan P. Early onset prosthetic joint infection and bacteremia due to Campylobacter fetus subspecies fetus. *Case Rep. Infect. Dis., 2017, vol. 2017: 5892846. doi: 10.1155/2017/5892846*
10. Dutta S., Chatterjee A., Dutta P., Rajendran K., Roy S., Pramanik K.C., Bhattacharya S.K. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol., 2001, vol. 50, no. 8, pp. 667–674. doi: 10.1099/0022-1317-50-8-667*
11. Esan O.B., Pearce M., van Hecke O., Roberts N., Collins D.R.J., Violato M., McCarthy N., Perera R., Fanshawe T.R. Factors associated with sequelae of Campylobacter and non-typhoidal Salmonella infections: a systematic review. *EBioMedicine, 2017, vol. 15, pp. 100–111. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.12.006*
12. Fitzgerald C., Patrick M., Gonzalez A., Akin J., Polage C.R., Wymore K., Gillim-Ross L., Xavier K., Sadlowski J., Monahan J., Hurd S., Dahlberg S., Jerris R., Watson R., Santovenia M., Mitchell D., Harrison C., Tobin-D'Angelo M., DeMartino M., Pentella M., Razeq J., Leonard C., Jung C., Achong-Bowe R., Evans Y., Jain D., Juni B., Leano F., Robinson T., Smith K., Gittelman R.M., Garrigan C., Nachamkin I. Multicenter evaluation of clinical diagnostic methods for detection and isolation of *Campylobacter* spp. from stool. *J. Clin. Microbiol., 2016, vol. 54, no. 5, pp. 1209–1215. doi: 10.1128/JCM.01925-15*
13. Gómez-Camarasa C., Gutiérrez-Fernández J., Rodríguez-Granger J.M., Sampedro-Martínez A., Sorlózano-Puerto A., Navarro-Marí J.M. Evaluation of the rapid RIDAQUICK Campylobacter® test in a general hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2014, vol. 78, no. 2, pp. 101–104. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.009*
14. Harvala H., Rosendal T., Lahti E., Engvall E.O., Brytting M., Wallensten A., Lindberg A. Epidemiology of Campylobacter jejuni infections in Sweden, November 2011-October 2012: is the severity of infection associated with C. jejuni sequence type? *Infect. Ecol. Epidemiol., 2016, vol. 6: 31079. doi: 10.3402/iee.v6.31079*
15. Hormeño L., Palomo G., Ugarte-Ruiz M., Porrero M.C., Borge C., Vadillo S., Píriz S., Domínguez L., Campos M.J., Quesada A. Identification of the main quinolone resistance determinant in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by MAMA-DEG PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2016, vol. 84, no. 3, pp. 236–239. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.002*
16. Kaakoush N.O., Castaño-Rodriguez N., Mitchell H.M., Man S.M. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. *Clin. Microbiol. Rev., 2015, vol. 28, no. 3, pp. 687–720. doi: 10.1128/CMR.00006-15*
17. Kitamura S., Matsumura N., Ohtake N., Kita M., Konishi I. Tubo-ovarian abscess with endometrial cyst probably infected by Campylobacter fetus: two cases. *J. Obstet. Gynaecol. Res., 2016, vol. 42, no. 8, pp. 1052–1057. doi: 10.1111/jog.13004*
18. Kuperman-Shani A., Vaknin Z., Mendlovic S., Zaidenstein R., Melcer Y., Maymon R. Campylobacter coli infection causing second trimester intrauterine growth restriction (IUGR): a case report and review of the literature. *Prenat. Diagn., 2015, vol. 35, no. 12, pp. 1258–1261. doi: 10.1002/pd.4670*
19. Mahendran V., Riordan S.M., Grimm M.C., Tran T.A., Major J., Kaakoush N.O., Mitchell H., Zhang L. Prevalence of Campylobacter species in adult Crohn's disease and the preferential colonization sites of Campylobacter species in the human intestine. *PLoS One, 2011, vol. 6, no. 9: e25417. doi: 10.1371/journal.pone.0025417*
20. Pacanowski J., Lalande V., Lacombe K., Boudraa C., Lesprit P., Legrand P., Trystram D., Kassis N., Arlet G., Mainardi J.L., Doucet-Populaire F., Girard P.M., Meynard J.L.; CAMPYL Study Group. Campylobacter bacteremia: clinical features and factors associated with fatal outcome. *Clin. Infect. Dis., 2008, vol. 47, no. 6, pp. 790–796. doi: 10.1086/591530*
21. Patrick M.E., Gilbert M.J., Blaser M.J., Tauxe R.V., Wagenaar J.A., Fitzgerald C. Human infections with new subspecies of Campylobacter fetus. *Emerg. Infect. Dis., 2013, vol. 19, no. 10, pp. 1678–1680. doi: 10.3201/eid1910.130883*
22. Platts-Mills J.A., Liu J., Gratz J., Mduma E., Amour C., Swai N., Taniuchi M., Begum S., Peñataro Yori P., Tilley D.H., Lee G., Shen Z., Whary M.T., Fox J.G., McGrath M., Kosek M., Haque R., Houpt E.R. Detection of Campylobacter in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. *J. Clin. Microbiol., 2014, vol. 52, no. 4, pp. 1074–1080. doi: 10.1128/JCM.02935-13*
23. Porter C.K., Choi D., Cash B., Pimentel M., Murray J., May L., Riddle M.S. Pathogen-specific risk of chronic gastrointestinal disorders following bacterial causes of foodborne illness. *BMC Gastroenterol., 2013, vol. 13: 46. doi: 10.1186/1471-230X-13-46*
24. Riddle M.S., Gutierrez R.L., Verdu E.F., Porter C.K. The chronic gastrointestinal consequences associated with campylobacter. *Curr. Gastroenterol. Rep., 2012, vol. 14, no. 5, pp. 395–405. doi: 10.1007/s11894-012-0278-0*
25. Schmidt-Ott R., Schmidt H., Feldmann S., Brass F., Krone B., Gross U. Improved serological diagnosis stresses the major role of Campylobacter jejuni in triggering Guillain–Barré syndrome. *Clin. Vaccine Immunol., 2006, vol. 13, no. 7, pp. 779–783. doi: 10.1128/CVI.00065-06*

26. Smith J.L., Bayles D.O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol., 2006, vol. 32, no. 4, pp. 227–248. doi: 10.1080/10408410601023557*
27. Suarez A., Parsons C., Parsons E., Gowe I., Vickery S. Diarrheal illness and prosthetic joint infection caused by Campylobacter coli following consumption of undercooked chicken wings. *IDCases, 2019, vol. 18: e00644. doi: 10.1016/j.idcr.2019.e00644*
28. Tracz D.M., Keelan M., Ahmed-Bentley J., Gibreel A., Kowalewska-Grochowska K., Taylor D.E. pVir and bloody diarrhea in Campylobacter jejuni enteritis. *Emerg. Infect. Dis., 2005, vol. 11, no. 6, pp. 838–843. doi: 10.3201/eid1106.041052*
29. Vasoo S., Schwab J.J., Cunningham S.A., Robinson T.J., Cass J.R., Berbari E.F., Walker R.C., Osmon D.R., Patel R. Campylobacter prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol., 2014, vol. 52, no. 5, pp. 1771–1774. doi: 10.1128/JCM.03572-13*
30. Zhang L. Oral Campylobacter species: Initiators of a subgroup of inflammatory bowel disease? *World J. Gastroenterol., 2015, vol. 21, no. 31, pp. 9239–9244. doi: 10.3748/wjg.v21.i31.9239*

Авторы:
Кожухова Е.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций при кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии НИЦ Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;
Андреева Н.В., врач-инфекционист организационно-методического отдела инфекционной службы СПбФГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия;
Дмитриева М.И., врач-инфекционист организационно-методического отдела инфекционной службы СПбФГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия;
Николаенко С.Л., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций при кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии НИЦ Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Kozhukhova E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Chronic Viral Infection Laboratory (Branch of the Infectious Diseases and Epidemiology Department), Research Center of Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Andreeva N.V., Physician, Organizational and Methodical Department Of Infectious Disease Service, Hospital named after S.P. Botkin for Infectious Diseases In Adults, St. Petersburg, Russian Federation;
Dmitrieva M.I., Physician, Organizational and Methodical Department Of Infectious Disease Service, Hospital named after S.P. Botkin for Infectious Diseases In Adults, St. Petersburg, Russian Federation;
Nikolaenko S.L., PhD (Medicine), Senior Researcher, Chronic Viral Infection Laboratory (Branch of the Infectious Diseases and Epidemiology Department), Research Center of Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила в редакцию 17.02.2022
Отправлена на доработку 28.07.2022
Принята к печати 10.04.2023

Received 17.02.2022
Revision received 28.07.2022
Accepted 10.04.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 535–548

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 535–548

КЛЕЩЕВЫЕ ТРАНСМИССИВНЫЕ ИНФЕКЦИИ НА ЮГЕ РОССИИ: СОВРЕМЕННАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ, НОВЫЙ ПОДХОД К ПОСТРОЕНИЮ ПРОГНОЗНЫХ И ОБЪЯСНЯЮЩИХ МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ (НА ПРИМЕРЕ АСТРАХАНСКОЙ РИККЕТСИОЗНОЙ И КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДОК)

Д.А. Прислегина[1,2], О.В. Малецкая[1], В.М. Дубянский[1,2], Т.В. Таран[1], А.Е. Платонов[2]

[1] *ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия*
[2] *ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия*

Резюме. В статье представлена характеристика современной эпидемиологической ситуации по клещевым трансмиссивным инфекциям (КТИ) на юге России с 2013 по 2022 г., предложен новый подход к разработке «прогнозных» моделей динамики заболеваемости Астраханской риккетсиозной лихорадкой (АРЛ) и Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ) в Астраханской области и продемонстрированы результаты проверки «объясняющих» моделей в 2022 г. для Ставропольского края и Астраханской области. *Материалы и методы.* Комплексное исследование было выполнено на основе методов эпидемиологического анализа и непараметрической статистики. Материалами для оценки проявлений эпидемического процесса КТИ послужили сведения из разработанных в формате проекта баз данных по заболеваемости АРЛ и КГЛ и карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (ф. № 357/у), предоставленных Управлениями Роспотребнадзора в субъектах Южного (ЮФО) и Северо-Кавказского (СКФО) федеральных округов. Модели заболеваемости были разработаны с использованием теоремы Байеса и последовательного статистического анализа Вальда, с предварительным вычислением информативности показателей по методу Кульбака. Значения климатических факторов взяты из базы данных ОИ ЦКП «ИКИ-мониторинг» Института космических исследований Российской академии наук. *Результаты.* Результаты исследования свидетельствуют о сохранении напряженной эпидемиологической ситуации по риккетсиозам группы клещевой пятнистой лихорадки, Ку-лихорадке, клещевому боррелиозу и КГЛ на территории юга России. Установлено широкое вовлечение в эпидемический процесс почти всех нозологических форм КТИ детей до 14 лет (в том числе раннего

Адрес для переписки:
Прислегина Дарья Александровна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (962) 448-73-57 (моб.). Тел./факс: 8 (865) 226-03-12.
E-mail: daria775@rambler.ru

Contacts:
Daria A. Prislegina
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (962) 448-73-57. Phone/fax: +7 (865) 226-03-12.
E-mail: daria775@rambler.ru

Для цитирования:
Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Таран Т.В., Платонов А.Е. Клещевые трансмиссивные инфекции на юге России: современная эпидемиологическая ситуация, новый подход к построению прогнозных и объясняющих моделей заболеваемости (на примере астраханской риккетсиозной и крымской геморрагической лихорадок) // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 535–548. doi: 10.15789/2220-7619-TBI-2036

Citation:
Prislegina D.A., Maletskaya O.V., Dubyanskiy V.M., Taran T.V., Platonov A.E. Tick-borne infections in the south of Russia: modern epidemiological situation, new approach to create "forecasting" and "Explaining" morbidity models (in astrakhan rickettsiosis fever and crimean-congo hemorrhagic fever) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 535–548. doi: 10.15789/2220-7619-TBI-2036

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20088), исполнители – Платонов А.Е., Дубянский В.М., Прислегина Д.А.
The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (Project No. 19-75-20088), conducted by A.E. Platonov, V.M. Dubyansky, D.A. Prislegina.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TBI-2036

и грудного возрастов) — пациентов групп риска по осложненному течению заболевания в связи с трудностью диагностики и лечения. Серьезную обеспокоенность вызывает ежегодная регистрация КТИ на территории курортных зон с последующим возникновением завозных случаев в других, в том числе неэндемичных, субъектах. Предложенные «прогнозные» модели позволяют составить прогноз заболеваемости КГЛ и АРЛ по каждому административному району Астраханской области с точностью до 91,7%. Точность «объясняющих» моделей по КГЛ для Ставропольского края и Астраханской области при проверке в 2022 г. составила 88,5 и 83,3% соответственно, по АРЛ — 91,7%. *Выводы.* Планируется продолжение работы по совершенствованию «прогнозных» и «объясняющих» моделей для их последующего использования при планировании профилактических мероприятий, а также создание подобных моделей по клещевому боррелиозу и Ку-лихорадке с целью стабилизации эпидемиологической ситуации по КТИ на юге России.

Ключевые слова: *клещевые трансмиссивные инфекции, климатические факторы, эпидемиологическая ситуация, прогнозирование заболеваемости, модель динамики заболеваемости «прогнозная», модель динамики заболеваемости «объясняющая».*

TICK-BORNE INFECTIONS IN THE SOUTH OF RUSSIA: MODERN EPIDEMIOLOGICAL SITUATION, NEW APPROACH TO CREATE "FORECASTING" AND "EXPLAINING" MORBIDITY MODELS (IN ASTRAKHAN RICKETTSIOSIS FEVER AND CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER)

Prislegina D.A.[a,b], Maletskaya O.V.[a], Dubyanskiy V.M.[a,b], Taran T.V.[a], Platonov A.E.[b]

[a] *Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation*
[b] *Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The article presents a description of the current tick-borne infection epidemiological situation in the south of Russia from the years 2013 to 2022, proposes a new approach to develop "forecasting" models for morbidity dynamics of Astrakhan rickettsial fever (ARF) and Crimean hemorrhagic fever (CCHF) in the Astrakhan region and presents data assessing 2022 "explaining" models for the Stavropol Territory and Astrakhan Region. *Materials and methods.* A comprehensive research was performed using epidemiological analysis and non-parametric statistical methods. The data assessing tick-borne infections epidemic process manifestations were retrieved from ARF and CCHF morbidity databases (developed as a project) and documents of infectious disease focus epidemiological examination provided by the departments of Rospotrebnadzor in the subjects of the Southern and North Caucasian Federal Districts. Morbidity models were developed using the Bayes' theorem and Wald's sequential statistical analysis, with a preliminary calculation of indicators informativeness by the Kullback method. The values of climatic factors from the database of the Center for Collective Use "IKI-monitoring" of the Space Research Institute of the Russian Academy of Sciences were used. *Results.* The results of the study indicate persistence of serious epidemiological situation regarding rickettsiosis of the tick-borne spotted fever group, Q fever, tick-borne borreliosis and CCHF in the south of Russia. Almost all tick-borne infections nosological forms in children under 14 years (including young children and infants) were widely involved in the epidemic process, which belong to patients at risk for a complicated disease course due to complicated diagnostics and treatment. The annual registration of tick-borne infections cases in the resort areas, with the subsequent occurrence of imported cases in other, including non-endemic regions poses a serious problem. The proposed "forecasting" models allow to predict the CCHF and ARF morbidity for each administrative district of the Astrakhan region with up to 91.7% accuracy. The "explaining" models CCHF accuracy for the Stavropol Territory and Astrakhan Region, when tested in 2022, was 88.5 and 83.3%, respectively, for ARF — 91.7%. *Conclusions.* The further continuation of "forecasting" and "explaining" models verification for planning preventive measures and propose similar steps for tick-borne borreliosis and Q fever to epidemiological tick-borne infections to stabilize situation in the south of Russia.

Key words: *tick-borne infections, climatic factors, epidemiological situation, forecasting morbidity, "forecasting" model for morbidity dynamics, "explaining" model for morbidity dynamics.*

Введение

Клещевые трансмиссивные инфекции (КТИ), которые на протяжении последних семи лет составляли более 50% в общей структуре заболеваемости природно-очаговыми инфекциями (ПОИ) в Российской Федерации, по-прежнему являются серьезной угрозой для здоровья населения нашей страны [3, 18, 19, 20, 27, 28, 37]. Несмотря на снижение числа выявленных случаев КТИ в 2020–2021 гг., связанных с сокращением числа специфических лабораторных исследований для их верификации и ограничительными мерами в период пандемии COVID-19, в 2022 г. уже вновь был отмечен рост числа больных такими нозологическими формами, как иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — с 3850 до 7257, клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) — с 989 до 1969, лихорадка Ку — с 8 до 158, и другими [13, 14, 19, 20]. Выраженным риском возникновения эпидемиологических осложнений по КТИ при этом характеризуются субъекты

юга европейской части нашей страны [3, 12, 13, 14, 23, 35]. Помимо регистрации заболеваемости широко распространенными на территории остальных округов России инфекционными болезнями, возбудители которых переносятся клещами, южный регион также является эндемичным по Астраханской риккетсиозной лихорадке (АРЛ), Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ) и марсельской лихорадке [2, 4, 13, 14, 15, 17, 21, 32, 33, 34, 35]. Кроме того, большинство от общего числа случаев Ку-лихорадки также ежегодно выявляется на юге страны [13, 14].

Таким образом, особое внимание для поддержания эпидемиологического благополучия на данной территории следует уделять анализу проявлений эпидемического процесса КТИ и риск-ориентированному прогнозированию заболеваемости этими опасными инфекциями для последующего научно-обоснованного составления плана профилактических мероприятий [22, 29, 30, 31, 36]. Прогнозные расчеты проявлений эпидемического процесса при этом целесообразно проводить не для всего субъекта в целом, а отдельно по каждому административному району, что позволит применять дифференцированный подход при последующем планировании профилактических мер и обеспечении готовности лечебно-профилактических организаций (ЛПО) для оказания помощи больным [7, 24]. Ранее авторами была предложена модель для составления эпидемиологического прогноза по КГЛ (на примере Ставропольского края) [9, 26]. Результаты апробации этого метода позволили разработать аналогичные «прогнозные» модели динамики заболеваемости КГЛ и АРЛ для Астраханской области, представленные в данной публикации. Кроме того, актуальность на сегодняшний день имеет продолжение работы по совершенствованию так называемых «объясняющих» моделей (на примере Астраханской области и Ставропольского края) для выявления возможных причин (обусловленных действием погодных условий или «внешних» факторов, непосредственно не связанных с эпидемическим процессом КГЛ и АРЛ) несоответствия прогнозных показателей фактически зарегистрированным [8, 25, 38]. Особый интерес представляют результаты работы этих моделей в период относительной стабилизации эпидемиологической ситуации по COVID-19 в 2022 г., также представленные в настоящей работе

Цель исследования — представить характеристику современной эпидемиологической ситуации по КТИ в субъектах юга европейской части России и предложить новый подход к созданию «прогнозных» и «объясняющих» моделей заболеваемости этими инфекциями на примере АРЛ и КГЛ.

Материалы и методы

Ретроспективный анализ заболеваемости КТИ (6291 случая) был проведен на основе данных официальной статистической отчетности, учетно-отчетной документации и аналитических материалов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека за 2013–2022 гг.:

- государственных докладов «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации»;
- форм федерального государственного статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»;
- внеочередных донесений «О регистрации случая Крымской геморрагической лихорадки»;
- карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (Ф. № 357/у), предоставленных Управлениями Роспотребнадзора в субъектах ЮФО и СКФО.

Для изучения проявлений эпидемического процесса КГЛ и АРЛ дополнительно были использованы сведения из разработанных для этих инфекций в формате проекта баз данных.

Значения климатических факторов — средней, максимальной и минимальной температуры воздуха (°С), относительной влажности воздуха (%), количества выпавших осадков (кг/м^2), атмосферного давления (Па), нормализованного вегетационного индекса (NDVI, в отн. ед.), влажности (%) и температуры (°С) почвы на глубине 10 и 40 см, глубины снега (м), доли площади, покрытой снегом (%), для создания, апробации и проверки «прогнозных» и «объясняющих» моделей заболеваемости КГЛ и АРЛ были взяты из базы данных ОИ ЦКП «ИКИ-мониторинг» Института космических исследований РАН с 2005 по 2022 г.

Исследование носило комплексный характер с применением эпидемиологического (включающего сбор, систематизацию информации, описательный и аналитических этапы) и статистических методов.

Для каждого субъекта юга России, а также ЮФО и СКФО в целом были рассчитаны интенсивные годовые (ИП) и среднемноголетние 2013–2022 гг. (СМП) показатели заболеваемости (на 100 тыс. населения) по каждой зарегистрированной нозологической форме КТИ и проанализированы:

- возрастная структура больных;
- соотношение городского и сельского населения среди заболевших;
- профессиональный состав и социальный статус;
- структура путей и условий заражения (в том числе связь с профессиональной деятельностью);

– клинические формы, тяжести течения и исходы.

Модели динамики заболеваемости были разработаны на основе непрерывной последовательной процедуры распознавания, теоремы Байеса и последовательного статистического анализа Вальда с предварительным вычислением коэффициентов информативности климатических факторов по методу Кульбака [5, 6, 9, 10, 26]. Принцип построения «объясняющих» моделей аналогичен алгоритму «прогнозных» за исключением использования в расчетах значений климатических факторов не предшествующего, а текущего эпидемического сезона [8, 25]. Значения «пороговых уровней» — медианы, среднего и третьего квартиля для моделей заболеваемости КГЛ составили 0,9; 3,5 и 4,7 (для Ставропольского края) и 0,5; 1; 2 (для Астраханской области), для модели заболеваемости АРЛ — 25; 39,5 и 62,4. Все математические вычисления проводились в ранее разработанной авторами программе на основе Microsoft Excel [9].

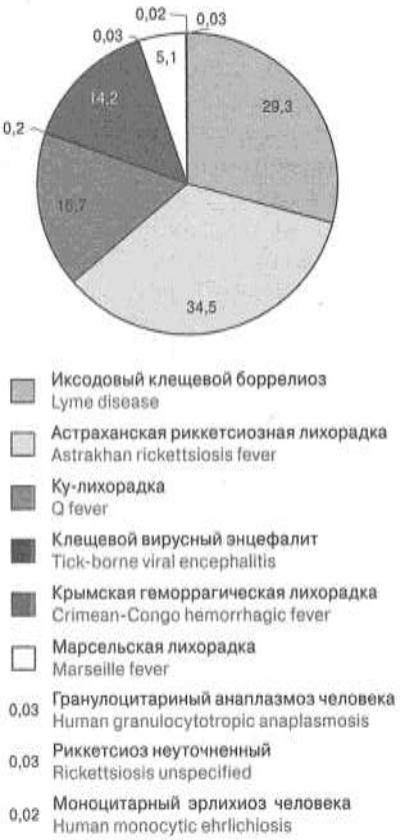


Рисунок 1. Нозологическая структура КТИ на территории юга Европейской части России (2013–2022 гг.) (в %)

Figure 1. The tick-borne infections nosological pattern in the south of the European part of Russia (2013–2022) (per cent)

Результаты

В течение исследуемого десятилетнего периода случаи КТИ регистрировались на территории всех субъектов ЮФО и СКФО, кроме Республики Ингушетия.

Структура заболеваемости была представлена 8 нозологическими формами. Ведущее место по числу больных занимали риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) — эндемичные для региона АРЛ и марсельская лихорадка, а также риккетсиозы неуточненной этиологии (рис. 1).

Всего с 2013 по 2022 г. было выявлено 2169 больных АРЛ. Заболевшие ежегодно регистрировались в Астраханской области (2130 случаев, СМП составил 20,96 на 100 тыс. населения) и с 2013 по 2019 г. — в Республике Калмыкия (38 больных, СМП 1,93 на 100 тыс. населения). В 2020 г. впервые диагноз «АРЛ» был установлен у жителя Республики Дагестан.

Все случаи марсельской лихорадки были зарегистрированы на территории Республики Крым — 249 (СМП 1,46 на 100 тыс. населения) и г. Севастополя — 69 (СМП 1,78 на 100 тыс. населения). В Краснодарском крае в 2017 г. были выявлены двое больных с диагнозом «риккетсиоз неуточненной этиологии».

Результаты анализа возрастного состава свидетельствуют о преобладании среди заболевших риккетсиозами группы КПЛ взрослого населения (от 18 до 70 лет и старше). Отмечалось вовлечение в эпидемический процесс детей до 14 лет (17,2%), в том числе раннего (до 3 лет) и грудного (до 1 года) возрастов. Так, в 2019 г. были зарегистрированы 2 случая АРЛ у девочек 3 и 11 месяцев в Астраханской области и 2 случая марсельской лихорадки у годовалых детей в Республике Крым. Заболеваемость регистрировалась в равной мере у лиц различных профессий и социального статуса. Среди больных отмечалось некоторое превалирование городских жителей (62,2%). Всем пациентам диагнозы «АРЛ» и «марсельская лихорадка» были установлены клинически на основании патогномоничных симптомов без лабораторного подтверждения. У большинства заболевших риккетсиозы группы КПЛ протекали в среднетяжелой форме (75,1%). Было зарегистрировано 11 летальных исходов, из них 10 при АРЛ (в АО в 2015–2016 гг.) и один случай микст-инфицирования: марсельская лихорадка + ГЛПС (в Республике Крым в 2021 г.).

Серьезной проблемой для здравоохранения юга России остается Ку-лихорадка (коксиеллез) — СМП по ЮФО (0,55 на 100 тыс. населения) и СКФО (0,31 на 100 тыс. населения) превысили среднероссийский показатель в 7,2 и 4,1 раз соответственно. В течение исследуемого периода был выявлен 1051 больной, большинство

из которых — в Астраханской области (70,5%) и Ставропольском крае (25,8%). Спорадические случаи отмечались в Волгоградской области (5 — в 2017 г. и по одному — в 2013, 2019 и 2022 гг.). В 2022 г. впервые заболевшие были зарегистрированы в Ростовской области (27) и Республике Калмыкия (4). В возрастной структуре преобладало взрослое трудоспособное население. Дети до 14 лет составили 12,8% (из них 6,7% раннего возраста). В Ставропольском крае в 2019 г. заболевание было диагностировано у беременной женщины на сроке 16 недель. Случаи Кулихорадки с одинаковой частотой регистрировали среди городских и сельских жителей. На долю профессионально угрожаемых по заражению категорий работников (занимающихся сельским хозяйством и животноводством) пришлось 36,8%. Диагноз в 62% случаев был лабораторно подтвержден методом иммуноферментного анализа (ИФА), в 36,8% — ПЦР и в 1,2% — обоими методами. У большинства больных отмечалось среднетяжелое течение заболевания (96,2%), тяжелые и легкие формы составили 2,1 и 1,7% соответственно.

Проявления эпидемического процесса ИКБ в ЮФО (СМП 0,95 на 100 тыс. населения) ежегодно отмечались на территории Краснодарского края (857, СМП 1,56), Республики Крым (388, СМП 2,26 на 100 тыс. населения), г. Севастополя (61, СМП 1,84 на 100 тыс. населения) и Волгоградской области (31, СМП 0,12 на 100 тыс. населения), а также (за исключением 2020 г.) в Ростовской области (142, СМП 0,37 на 100 тыс. населения) и в Республике Адыгея (35, СМП 0,97 на 100 тыс. населения). В 2022 г. больные (4) впервые были выявлены в Астраханской области. В СКФО (СМП 0,36) ежегодная заболеваемость наблюдалась в Ставропольском крае (291, СМП 1,02 на 100 тыс. населения), спорадические случаи регистрировались в Чеченской Республике (4 — в 2014 г., 10 — в 2019 г. и 2 — в 2022 г.), в Республике Дагестан (по одному в 2016–2017 гг., 3 — в 2018 г. и 4 — в 2019 г.), в Карачаево-Черкесской Республике (по два случая в 2018–2019 гг.) и Республике Северная Осетия — Алания (по одному больному в 2019 г. и 2021–2022 гг.).

Установлено, что 31,8% от общего числа больных ИКБ пришлось на территорию Черноморского побережья полуострова Крым, Краснодарского края и Кавказских Минеральных вод Ставропольского края. Кроме того, ежегодно отмечались эпизоды инфицирования *Borrelia burgdorferi* s.l. во время отдыха на этих курортах с последующим возникновением завозных случаев не только в других городах в разрезе субъекта, но и на других административных территориях юга России. В эпидемический процесс были вовлечены лица всех возрастных групп. Дети до 14 лет составили 13,4% (из них раннего возраста — 13,8%). Среди больных ИКБ преобладали городские жители (82,8%). Профессиональный состав заболевших был достаточно неоднородным, но связи между частотой заражения и родом их деятельности выявлено не было. Лабораторными методами диагноз был подтвержден в 88,9% случаев (ИФА — 96,1%, ПЦР — 1,1%, их сочетанием — 2,8%). В большинстве случаев отмечалось среднетяжелое течение заболевания — 98,3%, легкое и тяжелое — в 1,2% и 0,4% соответственно. Эритемные формы составили 75,4%.

Заражение КВЭ на эндемичной по этой инфекции территории юга России (полуострова Крым) было зарегистрировано в 2017 г. — у местного жителя г. Старый Крым. Однако завозные случаи этой КТИ в ЮФО отмечались с 2015 г. почти ежегодно (кроме 2016 и 2020 г.) Заболевшие, находясь в инкубационном периоде, прибыли из Уральского и Сибирского федеральных округов России, а также из Республики Беларусь (где отмечали присасывания клещей). Всего было выявлено 12 таких больных — на территории курортов Черноморского побережья (Республики Крым и Краснодарского края — 9 и 2 соответственно) и в Республике Адыгея (1). Все случаи заболевания были зарегистрированы исключительно среди взрослого городского населения (от 18 до 70 лет) и не были связаны с профессиональной деятельностью. У всех пациентов диагноз был лабораторно подтвержден методом ИФА. Менингеальная и менингоэнцефалитическая формы составили по 30,8% и 46,2% соответственно, лихорадочная — 23,1%. У большинства больных отмечалось среднетяжелое течение заболевания (76,9%), тяжелое — у 23,1%. Летальный исход был зарегистрирован в 2018 г. в Республике Крым (завозной случай из Свердловской области).

Серьезную опасность для эпидемиологического благополучия населения юга России попрежнему представляет КГЛ. В течение исследуемого периода было выявлено 894 случая заболевания, 34 из которых закончились летально. На территории ЮФО было зарегистрировано 573 больных (СМП 0,35 на 100 тыс. населения). Заболевшие ежегодно выявлялись на территории Ростовской области (397, СМП 0,9 на 100 тыс. населения), Республики Калмыкия (92, СМП 4,04 на 100 тыс. населения), а также, за исключением 2021 г., в Астраханской (31, СМП 0,42 на 100 тыс. населения) и Волгоградской (52, СМП 0,23 на 100 тыс. населения) областях. В СКФО (СМП 0,33 на 100 тыс. населения) ежегодная заболеваемость регистрировалась в Ставропольском крае (277, СМП 0,98 на 100 тыс. населения) и, за исключением 2016 г., в Республике Дагестан (41, СМП 0,15 на 100 тыс. населения). Спорадические случаи отмечались в Кабардино-Балкарской (по од-

ному больному в 2016 и 2021 гг.) и Карачаево-Черкесской Республике (1 в 2015 г.). Также были выявлены 3 завозных случая КГЛ на территории Центрального федерального округа — в Москве (в 2013 г., и в 2020 г., диагноз был установлен у 12-летнего ребенка) и Воронежской области (2015 г.). Инфицирование больных произошло во время отдыха в Республике Крым.

В возрастной структуре преобладали взрослые, дети до 14 лет составили 2,1%. Случаи КГЛ преимущественно регистрировались среди сельских жителей (85,8%). В эпидемический процесс были вовлечены лица различных профессиональных групп, но больше половины составили официально неработающие, занимающиеся разведением крупного и мелкого рогатого скота на личном подворье (64,8%). Наряду с заражением возбудителем КГЛ при реализации трансмиссивного механизма, были зарегистрированы случаи контактного пути передачи от больных: 2 случая в семейных очагах инфекции (в Ростовской области в 2021–2022 гг.) и 2 эпизода профессионального внутрибольничного инфицирования медицинских работников (в 2016 г. в Ставропольском крае и в 2021 г. в Республике Дагестан). Лабораторно диагноз был подтвержден результатами ПЦР в 40,5% случаев, ИФА — в 3,8%, сочетанием двух методом — в 55,7%. В большинстве случаев отмечалось среднетяжелое течение заболевания, легкое и тяжелое составили 0,4 и 34,8% соответственно. Проявления геморрагического синдрома различной степени выраженности были зарегистрированы у 44,5% больных. Следует отметить преобладание геморрагических форм КГЛ в 2020 г (у 67,7% пациентов) на фоне снижения общего уровня заболеваемости наряду с превалированием безгеморрагических форм в другие годы исследуемого периода [2, 13, 14].

Таким образом, учитывая высокую актуальность АРЛ для юга России (лидирующей по числу больных в общей структуре КТИ), а также

Таблица 1. Результаты апробации на 2018–2020 гг. (ретроспективно) и проверки на 2021–2022 г. «прогнозной» модели динамики заболеваемости КГЛ (на примере Астраханской области)

Table 1. The results of testing "forecasting" CCHF morbidity dynamics model based on 2018–2020 retrospective data and assessing 2021–2022 period (in the Astrakhan region)

Результат прогноза Forecast result	Годы									
	2018		2019		2020		2021		2022	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
Полностью совпадающий Correct	5	41,7	7	58,3	10	83,3	2	16,7	11	91,7
Ложноположительный False positive	5	41,7	4	33,3	–	–	10	83,3	1	8,3
Ложноотрицательный False negative	1	8,3	–	–	2	16,7	–	0,0	–	–
Завышенный Overestimated	1	8,3	1	8,3	–	–	–	–	–	–

Таблица 2. Результаты апробации на 2018–2020 гг. (ретроспективно) и проверки на 2021–2022 г. «прогнозной» модели динамики заболеваемости АРЛ (на примере Астраханской области)

Table 2. The results of testing "forecasting" ARF morbidity dynamics model using 2018–2020 retrospective data for and assessing for 2021–2022 (in the Astrakhan region)

Результат прогноза Forecast result	Годы									
	2018		2019		2020		2021		2022	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
Полностью совпадающий Correct	10	83,3	7	58,3	4	33,3	–	–	11	91,7
Ложноположительный False positive	–	–	–	–	4	33,3	2	16,7	–	–
Ложноотрицательный False negative	1	8,3	1	8,3	1	8,3	–	–	–	–
Завышенный Overestimated	–	–	4	33,3	3	25,0	10	83,3	1	8,3
Заниженный Underestimated	1	8,3	–	–	–	–	–	–	–	–

с целью проверки ранее предложенного метода прогнозирования КГЛ в Ставропольском крае на примере другого субъекта, авторами были разработаны «прогнозные» модели по этим инфекциям для Астраханской области. Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Полное совпадение прогнозируемых результатов с фактическими данными варьировало от 16,7% в 2021 г. до 91,7% в 2022 г. для модели по КГЛ и от 33,3% в 2020 г. до 91,7% в 2022 г. для модели по АРЛ.

Также в 2022 г. была проведена проверка ранее разработанных «объясняющих» моделей динамики заболеваемости КГЛ (на примере Ставропольского края и Астраханской области) и АРЛ. Полученные данные, а также их сопоставление с прогнозными результатами и фактическими показателями заболеваемости по каждому административному району этих субъектов представлены в табл. 3–5.

Точное совпадение результатов «объясняющих» моделей динамики заболеваемо-

Таблица 3. Сопоставление результатов «прогнозной» и «объясняющей» моделей динамики заболеваемости КГЛ для Ставропольского края (на примере 2022 г.)

Table 3. Comparison of "forecasting" and "explaining" CCHF morbidity dynamics models for the Stavropol Territory (in 2022)

	Административный район Administrative region	**Результат «прогноза»** "Forecast" result	**Трактовка прогноза** Interpretation of "forecast"	**Результат «объяснения»** "Explanation" result	**Трактовка «объяснения»** Interpretation of "explanation"	**Фактическая заболеваемость (на 100 тыс.)** Factual morbidity (per 100,000 population)
1	**Александровский** Alexandrovsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
2	**Андроповский** Andropovsky	≤ 3,5	**Верный** Right	≤ 3,5	**Верный** Right	2,99
3	**Апанасенковский** Apanasenkovsky	> 4,7	**Верный** Right	> 4,7	**Верный** Right	13,65
4	**Арзгирский** Arzgirsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	> 4,7	**Ложноположит.** False positive	0,00
5	**Благодарненский** Blagodarnensky	≤ 3,5	**Верный** Right	≤ 3,5	**Верный** Right	3,49
6	**Буденновский** Budennovsky	> 4,7	**Завышенный** Overstated	> 4,7	**Завышенный** Overstated	0,90
7	**Георгиевский** Georgievsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
8	**Грачевский** Grachevsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
9	**Изобильненский** Izobilnensky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
10	**Ипатовский** Ipatovsky	> 4,7	**Верный** Right	> 4,7	**Верный** Right	9,17
11	**Кировский** Kirovsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
12	**Кочубеевский** Kochubeevsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
13	**Красногвардейский** Krasnogvardeisky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
14	**Курский** Kursky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
15	**Левокумский** Levokumsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
16	**Минераловодский** Mineralovodsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
17	**Нефтекумский** Neftekumsky	> 4,7	**Завышенный** Overstated	> 4,7	**Верный** Right	1,58
18	**Новоалександровский** Novoaleksandrovsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
19	**Новоселицкий** Novoselytsky	> 4,7	**Завышенный** Overstated	> 4,7	**Завышенный** Overstated	3,82

Окончание таблицы 3. Сопоставление результатов «прогнозной» и «объясняющей» моделей динамики заболеваемости КГЛ для Ставропольского края (на примере 2022 г.)

Table 3. Comparison of "forecasting" and "explaining" CCHF morbidity dynamics models for the Stavropol Territory (in 2022) (continued)

	Административный район Administrative region	**Результат «прогноза»** "Forecast" result	**Трактовка прогноза** Interpretation of "forecast"	**Результат «объяснения»** "Explanation" result	**Трактовка «объяснения»** Interpretation of "explanation"	**Фактическая заболеваемость (на 100 тыс.)** Factual morbidity (per 100,000 population)
20	**Петровский** Petrovsky	≤ 3,5	**Верный** Right	≤ 3,5	**Верный** Right	1,44
21	**Предгорный** Predgornyy	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
22	**Советский** Soviet	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
23	**Степновский** Stepnovsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
24	**Труновский** Trunovsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
25	**Туркменский** Turkmensky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
26	**Шпаковский** Shpakovsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00

Таблица 4. Сопоставление результатов «прогнозной» и «объясняющей» моделей динамики заболеваемости КГЛ для Астраханской области (на примере 2022 г.)

Table 4. Comparison of the "forecasting" and "explaining" CCHF morbidity dynamics models for the Astrakhan region (in 2022)

	Административный район Administrative region	**Результат «прогноза»** "Forecast" result	**Трактовка прогноза** Interpretation of "forecast"	**Результат «объяснения»** "Explanation" result	**Трактовка «объяснения»** Interpretation of "explanation"	**Фактическая заболеваемость (на 100 тыс.)** Factual morbidity (per 100,000 population)
1	**Астрахань** Astrakhan	≤ 0,000009	**Верный** Right	> 2	**Ложноположит.** False positive	0,00
2	**Ахтубинский** Akhtubinsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
3	**Володарский** Volodarsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
4	**Енотаевский** Enotaevsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
5	**Икрянинский** Ikryaninsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
6	**Камызякский** Kamyzyaksky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
7	**Красноярский** Krasnoyarsky	> 2	**Верный** Right	> 2	**Верный** Right	5,50
8	**Лиманский** Limansky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
9	**Наримановский** Narimanovsky	> 2	**Ложноположит.** False positive	> 2	**Ложноположит.** False positive	0,00
10	**Приволжский** Privolzhskiy	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
11	**Харабалинский** Kharabalinsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
12	**Черноярский** Chernoyarsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00

Таблица 5. Сопоставление результатов «прогнозной» и «объясняющей» моделей динамики заболеваемости АРЛ для Астраханской области (на примере 2022 г.)

Table 5. Comparison of the "forecasting" and "explaining" CCHF morbidity dynamics models for the Astrakhan region (in 2022)

	Административный район Administrative region	**Результат «прогноза»** "Forecast" result	**Трактовка прогноза** Interpretation of "forecast"	**Результат «объяснения»** "Explanation" result	**Трактовка «объяснения»** Interpretation of "explanation"	**Фактическая заболеваемость (на 100 тыс.)** Factual morbidity (per 100,000 population)
1	**Астрахань** Astrakhan	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	1,93
2	**Ахтубинский** Akhtubinsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00
3	**Володарский** Volodarsky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	2,20
4	**Енотаевский** Enotaevsky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	4,10
5	**Икрянинский** Ikryaninsky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	8,81
6	**Камызякский** Kamyzyaksky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	4,38
7	**Красноярский** Krasnoyarsky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	11,00
8	**Лиманский** Limansky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	0,00
9	**Наримановский** Narimanovsky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 39,5	**Завышенный** Overstated	8,58
10	**Приволжский** Privolzhskiy	≤ 39,5	**Завышенный** Overstated	≤ 25	**Верный** Right	10,75
11	**Харабалинский** Kharabalinsky	≤ 25	**Верный** Right	≤ 25	**Верный** Right	23,34
12	**Черноярский** Chernoyarsky	≤ 0,000009	**Верный** Right	≤ 0,000009	**Верный** Right	0,00

сти КГЛ с фактическими данными составило 88,5% (23 района) и 83,3% (10 районов) для Ставропольского края и Астраханской области соответственно, АРЛ — 91,7% (11 районов). Кроме того, выявлено совпадение двух «завышенных» и одного «ложноположительного» результатов «объяснения» по КГЛ с таковыми «прогнозными» по Ставропольскому краю, и Астраханской области соответственно, что также подтверждает правильность работы «прогнозных» моделей.

Обсуждение

Таким образом, эпидемиологическая ситуация по КТИ на территории ЮФО и СКФО в течение исследуемого периода сохранялась напряженной. Благоприятные природно-климатические условия юга России способствовали поддержанию высокой активности природных очагов этих опасных инфекций и увеличению числа субъектов, вовлеченных в эпидемический процесс. Ежегодная регистрация случаев КТИ на территории курортных зон приводила к выносу инфекции в неэндемичные субъекты ЮФО и СКФО, а также в другие регионы страны. А появление даже одного больного такой особо опасной инфекцией, как КГЛ, в условиях недостаточной подготовки медицинского персонала и несвоевременного оказания квалифицированной помощи, помимо развития тяжелых форм, угрожающих жизни самого заболевшего, может также привести к формированию нозокомиальных очагов в медицинском учреждении [1].

Серьезного внимания требует проблема частого выявления большинства нозологических форм КТИ среди детского населения до 14 лет (особенно раннего возраста). Относительная трудность диагностики у детей вследствие преобладания диспепсического и лихорадочного синдрома над неярко выраженными патогномоничными симптомами при недостаточном сборе эпиданамнеза может привести к возникновению различных осложнений вследствие позднего назначения адекватного лечения [11, 16, 24, 27, 43, 45]. Настороженность вызывает

выявленный случай коксиеллеза у беременной женщины — согласно литературным данным, инфицирование *C. burnetii* во время беременности может привести не только к преждевременным родам и развитию тяжелых акушерских осложнений, но и к внутриутробной гибели плода [16, 39, 43, 45]. Проблемы с назначением медикаментозной терапии пациентам данной группы на фоне физиологически обусловленного снижения иммунного статуса часто способствуют переходу болезни в хроническую форму [11, 39, 43, 45].

Ежегодная регистрация тяжелых летальных случаев КГЛ наряду с выявлением эпизодов заражения возбудителем этой инфекции контактным путем (в семейных очагах и внутрибольничном инфицировании) может свидетельствовать о недостаточной бдительности в отношении этой опасной инфекции не только у населения эндемичных территорий, но и работников групп высокого профессионального риска, в том числе медицинского персонала.

В целях стабилизации эпидемиологической ситуации по КГЛ и АРЛ риск-ориентированному прогнозированию заболеваемости этими инфекциями в настоящее время уделяется особое внимание. Из немногочисленных отечественных публикаций следует отметить математические модели краткосрочного прогнозирования проявлений эпидемического процесса КГЛ и АРЛ на основе метода Крамера с учетом многофакторного влияния абиотических (средней температуры воздуха и объема осадков в сезонный подъем заболеваемости этими инфекциями) и биотических (индекс обилия иксодовых клещей) факторов, разработанные д.м.н. С.В. Углевой на примере Астраханской области [35]. Из зарубежных работ интерес представляют регрессионные модели для прогноза эпидемиологической ситуации по КГЛ в Иране и метод, основанный на системе нелинейных дифференциальных уравнений — в Уганде [41, 42, 44]. Также широко известна прогнозная модель типа SIR, разработанная в Турции (учитывающая данные по здоровым «восприимчивым» лицам (susceptible, «S»), «зараженным», являющимся источниками возбудителя инфекционной болезни (infected, «I») и «выздоровевшим», имеющим специфический иммунитет (recovered, «R») [40]. Вместе с тем, все эти модели предназначены для составления краткосрочного прогноза и расчета показателей заболеваемости в целом по субъекту, а не по отдельным административным районам, что может несколько ограничить возможности их последующего использования на практике. Методик для проведения «объясняющего» анализа текущей эпидемиологической ситуации по КГЛ и АРЛ на сегодняшний день нет. Однако поэтапная демонстрация («объяснение») опосредованной связи влияния климатических факторов текущего эпидемического сезона с наблюдаемой интенсивностью проявлений эпидемического процесса важна для установления возможных причин несоответствия прогнозируемых показателей фактическим. Так, совпадение полученных результатов «объясняющих» моделей с зарегистрированным числом больных при наличии ошибочного прогноза демонстрирует, что реализации прогнозируемого «порогового уровня» заболеваемости помешали погодные условия весенне-летнего периода, заранее учесть действие которых невозможно. Одновременное получение одинаковых «ошибок» по одному району в «Прогнозных» и «объясняющих» моделях может свидетельствовать о возможной гиподиагностике заболеваний (при «ложноположительных» или «завышенных» результатах) или «завозных» случаях (при «ложноотрицательных» ответах).

Анализ данных, полученных при апробации и проверке предложенных авторами моделей динамики заболеваемости КГЛ и АРЛ на примере Астраханской области, в целом свидетельствует об их удовлетворительной работе. Некоторое превалирование «завышенных» и «ложноположительных» результатов «прогнозных» моделей в 2020–2021 гг. может быть объяснено, тем, что показатели официально зарегистрированной заболеваемости КТИ в период пандемии COVID-19 вследствие объективных причин (в том числе изменений в организации медицинской деятельности профильных инфекционных стационаров и возможной гиподиагностики легких форм), вероятно, были ниже фактической. Данное предположение также косвенно подтверждается представленными результатами проверки «прогнозных» и «объясняющих» моделей в 2022 г. (характеризующимися более высокой точностью) в условиях снижения интенсивности проявлений эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Кроме того, учитывая нестабильность эпидемиологической ситуации по КГЛ и АРЛ в Астраханской области, использование в дальнейшем «прогнозных» моделей, может способствовать повышению эффективности планирования неспецифических профилактических мер в условиях отсутствия препаратов для специфической профилактики этих инфекций. Так, результаты ранее разработанной «прогнозной» модели динамики заболеваемости КГЛ (на примере Ставропольского края) ежегодно перед началом эпидемического сезона направляются в Управление Роспотребнадзора и Министерство Здравоохранения по Ставропольскому краю. Для наиболее эпидемиоло-

гически неблагополучных (согласно данным прогноза) административных районов, помимо проведения акарицидных мероприятий, рекомендуется усиление контроля за проведением информационно-разъяснительной работы среди населения и инструктажей с группами риска о мерах профилактики этой опасной инфекции, а также за обеспечением готовности ЛПО и медицинских работников к оказанию своевременной квалифицированной помощи больным.

В качестве перспективы развития исследования в дальнейшем планируется разработка подобных «прогнозных» и «объясняющих» моделей для других актуальных на юге России КТИ — КБ и Ку-лихорадки.

Список литературы/References

1. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Волынкина А.С., Таран Т.В., Манин Е.А., Куличенко А.Н. Обзор нозокомиальных случаев заражения вирусом Крымской-Конго геморрагической лихорадки // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 8, № 4. С. 39–47. [Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Prislegina D.A., Volynkina A.S., Taran T.V., Manin E.A., Kulichenko A.N. The analysis of nosocomial cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2019, vol. 8, no. 4, pp. 39–47. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2305-3496-2019-14006*
2. Волынкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 1. С. 24–28. [Volynkina A.S., Kotenev E.S., Lisitskaya Ya.V., Maletskaya O.V., Shaposhnikova L.I., Kulichenko A.N. Epidemiological situation on Crimean hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2016, and prognosis for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2017, no. 1, pp. 24–28. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-24-28*
3. Волынкина А.С., Малецкая О.В., Скударева О.Н., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Прислегина Д.А., Василенко Е.И., Тохов Ю.М., Тищенко И.В., Колосов А.В., Ростовцева Д.В., Василенко Н.Ф., Дубянский В.М., Яцменко Е.В., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 2. С. 6–11. [Volynkina A.S., Maletskaya O.V., Skudareva O.N.; Lisitskaya Y.V., Shaposhnikova L.I., Prislegina D.A., Vasilenko E.I., Tokhov Yu.M., Tishchenko I.V., Kolosov A.V., Rostovtseva D.V., Vasilenko N.F., Dubyansky V.M., Yatsmenko E.V., Kulichenko A.N. Epidemiological situation on Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2022, no. 2, pp. 6–11. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2022-2-6-11*
4. Волынкина А.С., Малецкая О.В., Скударева О.Н., Тищенко И.В., Василенко Е.И., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Колосов А.В., Ростовцева Д.В., Василенко Н.Ф., Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Яцменко Е.В., Куличенко А.Н. Анализ эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 1. С. 17–22. [Volynkina A.S., Maletskaya O.V., Skudareva O.N., Tishchenko I.V., Vasilenko E.I., Lisitskaya Ya.V., Shaposhnikova L.I., Kolosov A.V., Rostovtseva D.V., Vasilenko N.F., Dubyansky V.M., Prislegina D.A., Yatsmenko E.V., Kulichenko A.N. Analysis of epidemiological situation on Crimean hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2020 and prognosis for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2021, no. 1, pp. 17–22. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-17-22*
5. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978. 294 с. [Gubler E.V. Computational methods for analysis and identification of pathological processes. *Leningrad: Medicine, 1978. 294 p. (In Russ.)*]
6. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. 141 с. [Gubler E.V., Genkin A.A. Application of statistical non-parametric criteria in medico-biological investigations. *Leningrad: Medicine, 1973. 141 p. (In Russ.)*]
7. Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Куличенко А.Н. Риск-ориентированная модель прогнозирования эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке (на примере Ставропольского края) // Анализ риска здоровью. 2018. № 1. С. 13–21. [Dubyanskiy V.M., Prislegina D.A., Kulichenko A.N. Risk-oriented model for predicting epidemiological situation with Crimean-Congo hemorrhagic fever (on the example of Stavropol region). *Analiz riska zdorov'yu = Health Risk Analysis, 2018, no. 1, pp. 13–21. (In Russ.)*] *doi: 10.21668/health.risk/2018.1.02*
8. Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Платонов А.Е. «Объясняющие» модели заболеваемости клещевыми инфекциями (на примере Астраханской риккетсиозной и Крымской-Конго геморрагической лихорадок) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023. Т.100, № 1. С. 34–45. [Dubyanskiy V.M., Prislegina D.A., Platonov A.E. Explanatory models for tick-borne disease incidence (Astrakhan rickettsial fever and Crimean-Congo hemorrhagic fever). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2023, vol. 100, no. 1, pp. 34–45. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-344*
9. Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Платонов А.Е. Прогнозирование заболеваемости Крымской геморрагической лихорадкой на основе данных спутникового мониторинга (дистанционного зондирования Земли из космоса) на примере Ставропольского края // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 3. С. 322–335. [Dubyanskiy V.M., Prislegina D.A., Platonov A.E. Predicting incidence of Crimean-Congo hemorrhagic fever using satellite monitoring (remote sensing) data in the Stavropol Territory. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2022, vol. 99, no. 3, pp. 322–335. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-213*
10. Дубянский М.А., Кенжебаев А., Степанов В.М., Асенов Г.А., Дубянская Л.Д. Прогнозирование эпизоотической активности чумы в Приаралье и Кызылкумах. Нукус: Каракалпакстан, 1992. 240 с. [Dubyanskiy M.A., Kenzhebaev A.,

Stepanov V.M., Asenov G.A., Dubyanskaia L.D. Prognostication of plague epizootic activity in Sub-Aral and Kyzylkum Areas. *Nukus: Karakalpakstan, 1992. 240 p. (In Russ.)*]

11. Крамарь Л.В., Невинский А.Б., Каплунов К.О. Лихорадка Ку // Лекарственный вестник. 2020 . Т. 14, № 2 (78). С. 35–40. [Kramar L.V., Nevinsky A.B., Kaplunov K.O. Q fever. *Lekarstvennyy vestnik = Medicinal Bulletin, 2020, vol. 14, no. 2 (78), pp. 35–40. (In Russ.)*]
12. Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Котенев Е.С., Писаренко С.В., Шапошникова Л.И., Лисицкая Я.В., Василенко Н.Ф., Цыганкова О.И., Евченко Ю.М., Тохов Ю.М., Савельев В.Н., Тихонов С.Н., Пеньковская Н.А. Новый генетический вариант вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выявленный в Крыму // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34, № 2. С. 76–80. [Kulichenko A.N., Volynkina A.S., Kotenev E.S., Pisarenko S.V., Shaposhnikova L.I., Lisitskaya Y.V., Vasilenko N.F., Tsygankova O.I., Evchenko Y.M., Tohov Y.M., Savel'ev V. N., Tihonov S.N., Penkovskaya N.A. A new genetic variant of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Crimea. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya =Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2016, vol. 34, no. 2, pp. 76–80. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-76-80*
13. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Семенко О.В., Газиева А.Ю., Ашибоков У.М. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2019 г. Аналитический обзор. Ставрополь, 2020. 96 с. [Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Prislegina D.A., Vasilenko N.F., Semenko O.V., Gaziyeva A.Yu., Ashibokov U.M. Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the Southern and North Caucasian federal districts in 2019. Analytical review. *Stavropol, 2020. 96 p. (In Russ.)*]
14. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Махова В.В., Таран Т.В., Василенко Н.Ф., Ашибоков У.М. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2020 г. Аналитический обзор. Ставрополь, 2021. 91 с. [Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Prislegina D.A., Makhova V.V., Taran T.V., Vasilenko N.F., Ashibokov U.M. Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the Southern and North Caucasian federal districts in 2020. Analytical review. *Stavropol, 2021. 91 p. (In Russ.)*]
15. Куличенко А.Н., Прислегина Д.А. Крымская геморрагическая лихорадка: климатические предпосылки изменений активности природного очага на юге Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 162–172. [Kulichenko A.N., Prislegina D.A. Climatic prerequisites for changing activity in the natural Crimean-Congo hemorrhagic fever focus in the South of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 162–172. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-162-172*
16. Лукин Е.П., Мищенко О.А., Борисевич С.В. Лихорадка Ку в XXI в.: материал для подготовки лекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 8, № 4. С. 62–77. [Lukin E.P., Mishchenko O.A., Borisevich S.V. Q Fever: XXI Century (lecture material). *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2019, vol. 8, no. 4, pp. 62–77. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2305-3496-2019-14009*
17. Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Волынкина А.С., Семенко О.В., Василенко Н.Ф., Тарасов М.А., Цапко Н.В. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Крымская геморрагическая лихорадка. Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 4. С. 75–80. [Maletskaya O.V., Taran T.V., Prislegina D.A., Dubyansky V.M., Volynkina A.S., Semenko O.V., Vasilenko N.F., Tarasov M.A., Tsapko N.V. Natural-Focal Viral Fevers in the South of the European Part of Russia. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2020, no. 4, pp. 75–80. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2020-4-75-80*
18. Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Колясникова Н.М., Бондаренко Е.И., Платонов А.Е. Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов Borrelia miyamotoi // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. № 3. С. 339–350. [Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Kolyasnikova N.M., Bondarenko E.I., Platonov A.E. Development and application of the technique for identification of Borrelia miyamotoi surface antigens. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2021, no. 3, pp. 339–350. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-142*
19. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. 256 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020: State report. *Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2021. 256 p. (In Russ.)*]
20. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 340 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2021: State report. *Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2021. 340 p.*]
21. Платонов А.Е., Авксентьев Н.А., Авксентьева М.В., Деркач Е.В., Платонова О.В., Титков А.В., Колясникова Н.М. Социально-экономическое бремя пяти природно-очаговых инфекций в Российской Федерации // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2015. Т. 8, № 1. С. 47–56. [Platonov A.E., Avksentyev N.A., Avksentyeva M.V., Derkach E.V., Platonova O.V., Titkov A.V., Kolyasnikova N.M. Social and economic burden of five natural focal infections in the Russian Federation. *Farmakoekonomika. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya = Pharmacoeconomics. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology, 2015, vol. 8, no. 1, pp. 47–56. (In Russ.)*] *doi: 10.17749/2070-4909.2015.8.1.047-056*
22. Платонов А.Е., Гриднева К.А., Долгин В.А., Колясникова Н.М., Платонова О.В., Титков А.В. Применение дистанционного спутникового мониторинга для контроля и прогноза заболеваемости природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2013. Т. 10, № 3. С. 21–32. [Platonov A.E., Gridneva K.A., Dolgin V.A., Kolyasnikova N.M., Platonova O.V., Titkov A.V. The use of satellite remote sensing for monitoring and forecasting of vector-borne infections. *Sovremennye problemy distantsionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa = Current Problems in Remote Sensing of the Earth from Space, 2013, vol. 10, no. 3, pp. 21–32. (In Russ.)*]

23. Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Куличенко А.Н. Особо опасные арбовирусные лихорадки на юге России: совершенствование мониторинга с применением современных информационных технологий // Медицина труда и экология человека. 2019. № 4. С. 50–58. [Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Kulichenko A.N. Particular dangerous arbovirus fevers in the south of Russia: improvement of monitoring with modern information technology application. *Meditsina truda i ekologiya cheloveka = Occupational Health and Human Ecology, 2019, no. 4, pp. 50–58. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2411-3794-2019-10047*
24. Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Куличенко А.Н., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Ковальчук И.В. Крымская геморрагическая лихорадка в Ставропольском крае: современные клинико-эпидемиологические аспекты и новый подход к прогнозированию заболеваемости // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. № 3. С. 49–56. [Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N., Vasilenko N.F., Manin E.A., Kovalchuk I.V. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Stavropol region: contemporaryclinical and epidemiological aspects and new approach to forecasting of morbidity. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2018, no. 3, pp. 49–56. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2305-3496-2018-13007*
25. Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Платонов А.Е., Малецкая О.В. Влияние природно-климатических факторов на эпидемиологическую ситуацию по природно-очаговым инфекциям // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 1, № 5. С. 820–836. [Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Platonov A.E., Maletskaya O.V. Effect of the natural and climatic factors on epidemiological situation related to natural focal infections. *Infektsiya i immunitet =Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 820–836. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-EOT-1631*
26. Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Платонов А.Е. Крымская геморрагическая лихорадка в Северо-Кавказском федеральном округе: обзор эпидемиологической ситуации и совершенствование методики прогнозирования заболеваемости // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 357–365. [Prislegina D.A., Maletskaya O.V., Dubyanskiy V.M., Platonov A.E. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the North Caucasian Federal District: overview of the epidemiological situation and improvement of morbidity forecasting method. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 357–365. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-CHF-1827*
27. 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: OOO ITS "Omskiy nauchnyy vestnik", 2019. 146 p. (In Russ.)*]
28. Рудакова С.А., Пеньевская Н.А., Блох А.И., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В. Эпидемиологическая ситуация по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2019 г. в сравнении с периодом 2002–2018 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 3. С. 131–138. [Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Rudakov N.V., Trankvilevsky D.V. Epidemiological Situation on Tick-Borne Borreliosis in the Russian Federation in 2019 Compared to the Period of 2002–2018. *osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2020, no. 3, pp. 131–138. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-131-138*
29. Симонова Е.Г., Сергевнин В.И. Предэпидемическая диагностика в системе риск ориентированного эпидемиологического надзора над инфекционными болезнями // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17, № 5. С. 31–37. [Simonova E.G., Sergevnin V.I. Pre-epidemic diagnosis in the system risk-oriented epidemiological surveillance of infectious diseases. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2018, vol. 17, no. 5, pp. 31–37. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-31-37*
30. Симонова Е.Г. Современный этап развития эпидемиологического надзора и перспективы его совершенствования // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 4. С. 4–7. [Simonova E.G. Modern stage of development of the epidemiological surveillance and prospects of its improvement. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 4–7. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-4-4-7*
31. Титков А.В., Платонов А.Е., Стуколова О.А., Миронов К.О., Дмитриева Г.М., Кострыкина Т.В., Сорокина О.В., Черных В.И., Миноранская Н.С. Эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае в контексте изучения распространенности инфекции, вызываемой Borrelia miyamotoi // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. № 3. С. 10–18. [Titkov A.V., Platonov A.E., Stukolova O.A., Mironov K.O., Dmitrieva G.M., Kostrykina T.V., Sorokina O.V., Chernykh V.I., Minoranskaya N.S. Epidemiological features of ixodes tick-borne borelioses in the Krasnoyarsk Territory in the context of searching for the cases of infection caused by Borrelia miyamotoi. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2018, no. 3, pp. 10–18. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-2018-3-10-18*
32. Углева С.В., Акимкин В.Г., Понежева Ж.Б., Ахмерова Р.Р., Спиренкова А.Е., Черникова Ю.Ю., Шабалина С.В. Эпидемиологическая общность и различия актуальных для Астраханской области трансмиссивных инфекций // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 6. С. 63–71. [Ugleva S.V., Akimkin V.G., Ponezheva Zh.B., Akhmerova R.R., Spirenkova A.E., Chernikova Yu.Yu., Shabalina S.V. Epidemiological community and differences of transmissive infections in Astrakhan Region. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2021, vol. 20, no. 6, pp. 63–71. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-6-63-71*
33. Углева С.В., Акимкин В.Г., Понежева Ж.Б., Василькова В.В., Шабалина С.В. Сравнительная клиническая характеристика Астраханской пятнистой и Крымской геморрагической лихорадок в Астраханской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2022. № 2. С. 42–49. [Ugleva S.V., Akimkin V.G., Ponezheva Zh.B., Vasilkova V.V., Shabalina S.V. The comparative clinical characteristics of Astrakhan spotted fever and Crimean hemorrhagic fever in the Astrakhan Region. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy = Epidemiology and infectious diseases. Topical issues, 2022, no. 2, pp. 42–49. (In Russ.)*] *doi: 10.18565/epidem.2022.12.2.42-9*
34. Углева С.В., Кузнецов С.Д., Шабалина С.В. Крымская геморрагическая лихорадка // Инфекционные болезни. 2017. Т. 15, № 4. С. 60–67. [Ugleva S.V., Kuznetsov S.D., Shabalina S.V. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Infektsionnyye bolezni = Infectious diseases, 2017, vol. 15, no. 4, pp. 60–67. (In Russ.)*] *doi: 10.20953/1729-9225-2017-4-60-67*

35. Углева С.В., Шендо Г.Л., Курбангалиева А.Р., Куликова Л.Н., Шабалина С.В. Сравнительная характеристика эпидемических процессов природно-очаговых инфекций, доминирующих на территории Астраханской области // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 14, № 1. С. 59–64. [Ugleva S.V., Shendo G.L., Kurbangalieva A.R., Kulikova L.N., Shabalina S.V. Comparative Characteristics of Epidemic Processes Natural Focal Tick-Borne Infections, Dominant in the Astrakhan Region. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 59–64. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-1-59-64*
36. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина, 2007. 480 с. [Cherkasskii B.L. Risk in Epidemiology. *Moscow: Practical Medicine, 2007. 480 p. (In Russ.)*]
37. Шестопалов Н.В., Шашина Н.И., Германт О.М., Пакскина Н.Д., Царенко В.А., Веригина Е.В., Бойко Л.С. Информационное письмо «Природно-очаговые инфекции, возбудителей которых передают иксодовые клещи, и их неспецифическая профилактика в Российской Федерации (по состоянию на 01.01.2019)» // Дезинфекционное дело. 2019. № 1 (107). С. 37–44. [Shestopalov N.V., Shashina N.I., Germant O.M., Pakskina N.D., Tsarenko V.A., Verigina E.V., Boyko L.S. Information letter «Natural and focal infections, which agents are passed by ixodic ticks, and their nonspecific preventive measures in the Russian Federation (according to 01.01.2019)». *Dezinfektsionnoe Delo = Disinfection Affairs, 2019, no. 1 (107), pp. 37–44. (In Russ.)*]
38. Ansari H., Shahbaz B., Izadi S., Zeinali M., Tabatabaee S.M., Mahmoodi M., Holakouie Naieni K., Mansournia M.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relationship with climate factors in southeast Iran: a 13-year experience. *J. Infect. Dev. Ctries., 2014, vol. 8, no. 6, pp. 749–757. doi: 10.3855/jidc.4020*
39. Carcopino X., Raoult D., Bretelle F., Boubli L., Stein A. Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. *Clin. Infect. Dis, 2007, vol. 45, no. 5, pp. 548–555. doi: 10.1086/520661*
40. Estrada-Peña A., Vatansever Z., Gargili A., Buzgan T. An early warning system for Crimean-Congo haemorrhagic fever seasonality in Turkey based on remote sensing technology. *Geospat. Health, 2007, vol. 2, no. 1, pp. 127–135. doi: 10.4081/gh.2007.261*
41. Mostafavi E., Chinikar S., Bokaei S., Haghdoost A. Temporal modeling of Crimean-Congo hemorrhagic fever in eastern Iran. *Int. J. Infect. Dis., 2013, vol. 17, no. 7, pp. 524–528. doi: 10.1016/j.ijid.2013.01.010*
42. Mostafavi E., Haghdoost A., Irani A.D., Bokaei S., Chinikar S. Temporal modeling of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Int. J. Infect. Dis., 2013, vol. 17, no. 7, pp. e524–e528. doi: 10.1016/j.ijid.2013.01.010*
43. Raoult D., Tissot-Dupont H., Foucault C., Gouvernet J., Fournier P.E., Bernit E., Stein A., Nesri M., Harle J.R., Weiller P.J. Q fever 1985–1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore), 2000, vol. 79, no. 2, pp. 109–123. doi: 10.1097/00005792-200003000-00005*
44. Switkes J., Nannyonga B., Mugisha J.Y., Nakakawa J. A mathematical model for Crimean-Congo haemorrhagic fever: tick-borne dynamics with conferred host immunity. *J. Biol. Dyn., 2016, no. 10, pp. 59–70. doi: 10.1080/17513758.2015.1102976*
45. Tissot-Dupont H., Vaillant V., Rey S., Raoult D. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin. Infect. Dis., 2007, vol. 44, no. 2, pp. 232–237. doi: 10.1086/510389*

Авторы:

Прислегина Д.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия; член временного научного коллектива по выполнению гранта РНФ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Малецкая О.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной и противоэпидемической работе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Дубянский В.М., д.б.н., зав. отделом эпизоотологического мониторинга и прогнозирования ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия; член временного научного коллектива по выполнению гранта РНФ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Таран Т.В., д.м.н., зав. лабораторией подготовки специалистов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Платонов А.Е., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологии природно-очаговых инфекций ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Prislegina D.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Epidemiology, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation; Member of the Temporary Research Team for the Implementation of the Grant of the Russian Science Foundation, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Maletskaya O.V., DSc (Medicine), Professor, Deputy Director for Scientific and Anti-Epidemic Work, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Dubyanskiy V.M., DSc (Biology), Head of the Department of Epizootological Monitoring and Prognostication, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation; Member of the Temporary Research Team for the Implementation of the Grant of the Russian Science Foundation, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Taran T.V., DSc (Medicine), Head of the Laboratory for Specialist Training, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Platonov A.E., DSc (Biology), Professor, Head Researcher, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.09.2022
Отправлена на доработку 17.11.2022
Принята к печати 21.06.2023

Received 20.09.2022
Revision received 17.11.2022
Accepted 21.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 549–558

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 549–558

ASSESSMENT OF PROTEIN S AND C LEVEL AND ITS RELATIONSHIP WITH HEALTH-RELATED FACTORS IN PEOPLE LIVING WITH HIV: A CROSS-SECTIONAL STUDY

E. Rezaei[a], E. Jamali[b], Z. Foroozanfar[c], F. Ataei[a], S. Beheshti[c], H. Joulaei[c]

[a] *Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
[b] *Peyvand Pathobiology and Genetic Laboratory, Shiraz, Iran*
[c] *HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

Abstract. *Introduction.* Not only does Human Immunodeficiency Virus (HIV) threaten the complications associated with immunodeficiency, but also does it cause a set of chronic conditions that may lead to serious problems in these patients. Hypercoagulable state and other hematologic manifestations are reported as leading factors in various clinical problems like deep vein thrombosis in People Living with HIV (PLHIV). The present study aimed to investigate whether there is any correlation between proteins S and C levels (the thrombophilic conditions in HIV seropositive cases) and hematological factors, biochemical markers, CD4 count, HIV viral load, anti-retroviral therapy, Hepatitis C (HCV) and hepatitis B (HBV) confection, drug use, infectious diseases, and demographic characteristics. *Materials and methods.* Protein S and C levels in 100 PLHIV were measured. Coagulation tests, CD4 count, HIV viral load, biochemical and hematological factors, and infectious tests were measured in these cases to assess any possible correlation between these factors and the patients' proteins S and C levels. *Results.* Protein S, and C deficiency among PLHIV 8% and 10%, respectively. Red blood cell, hemoglobin, hematocrit, fasting blood sugar, and albumin were directly related to protein S, and the patients with positive VDRL significantly had a lower level of protein S. The patients receiving anti-retroviral therapy and those with positive VDRL had a higher level of protein C. CD4 count, prothrombin time, and cholesterol had also a direct correlation with protein C level. *Conclusion.* According to our results and the reduction of protein S, protein C, and the other factors affecting the lifestyle of PLHIV, there is an urge to pay special attention to thromboembolic disease. Moreover, there is a more possibility of hemostatic imbalances and coagulation disorders in them.

Key words: *human immunodeficiency virus, protein C, protein S, thrombosis, venous thromboembolism, AIDS.*

ОЦЕНКА УРОВНЯ ПРОТЕИНОВ S И C И ЕГО СВЯЗЬ С ФАКТОРАМИ, СВЯЗАННЫМИ СО ЗДОРОВЬЕМ, У ЛЮДЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ: ПОПЕРЕЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Резаи Э.[1], Джамали Э.[2], Форузанфар З.[3], Атаи Ф.[1], Бехешти Ш.[3], Джулаи Х.[3]

[1] *Университет Тарбиат Модарес, Тегеран, Иран*
[2] *Пейвандская лаборатория патобиологии и генетики, г. Шираз, Иран*
[3] *Ширазский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Институт здравоохранения Ширазского университета медицинских наук, г. Шираз, Иран*

Резюме. *Введение.* Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) не только угрожает осложнениями, связанными с подавлением иммунитета, но также вызывает ряд хронических состояний, которые могут привести к се-

Адрес для переписки:
Хассан Джулаи
ул. Лаван, г. Шираз, Иран.
Тел.: +98-9177121762.
E-mail: hassan.joulaei270@gmail.com

Contacts:
Hassan Joulaei
Lavan str., Shiraz, Iran.
Phone: +98-9177121762.
E-mail: hassan.joulaei270@gmail.com

Для цитирования:
Резаи Э., Джамали Э., Форузанфар З., Атаи Ф., Бехешти Ш., Джулаи Х. Оценка уровня протеинов S и C и его связь с факторами, связанными со здоровьем, у людей, живущих с ВИЧ: поперечное исследование // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 549–558. doi: 10.15789/2220-7619-AOP-2629

Citation:
Rezaei E., Jamali E., Foroozanfar Z., Ataei F., Beheshti S., Joulaei H. Assessment of protein S and C level and its relationship with health-related factors in people living with HIV: a cross-sectional study // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 549–558. doi: 10.15789/2220-7619-AOP-2629

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOP-2629

рьезным проблемам у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Гиперкоагуляция и другие гематологические проявления являются ведущими факторами различных клинических проблем у людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), например таких как тромбоз глубоких вен. Настоящее исследование было посвящено выявлению какой-либо корреляции между уровнями протеинов S и C (обладающих антикоагулянтным и профибринолотическим действием) и гематологическими факторами, биохимическими маркерами, количеством CD4 Т-клеток, вирусной нагрузкой, антиретровирусной терапией, коинфекцией гепатитом С (ВГС) и гепатитом В (ВГВ), употреблением наркотиков, инфекционными заболеваниями и демографическими характеристиками. *Материалы и методы.* Уровни протеинов S и C были измерены у 100 ЛЖВ: оценивали результаты тестов на коагуляцию, количество CD4 Т-клеток, вирусную нагрузку, биохимические и гематологические показатели, а также данные тестов для выявления инфекционных агентов с целью обнаружения любой возможной корреляции между перечисленными показателями и уровнями протеинов S и C. *Результаты.* Дефицит протеина S и C среди ЛЖВ составили 8 и 10% соответственно. Уровень эритроцитов, гемоглобина, гематокрит, уровень сахара в крови натощак и альбумина были напрямую связаны с уровнем протеина S, у пациентов с положительным VDRL-тестом (модификация реакции Вассермана) был установлен значительно более низкий уровень протеина S. У пациентов, получавших антиретровирусную терапию, и у пациентов с положительным результатом VDRL-теста был выявлен более высокий уровень протеина C. Количество CD4 Т-клеток, протромбиновое время и уровень холестерина также прямо коррелировали с уровнем протеина C. *Заключение.* Учитывая полученные результаты, можно сделать вывод о необходимости контроля системы свертывания крови у ЛЖВ с целью предотвращения развития тромбоэмболических заболеваний у ЛЖВ.

Ключевые слова: *вирус иммунодефицита человека, протеин C, протеин S, тромбоз, венозная тромбоэмболия, СПИД.*

Introduction

Protein C and protein S, produced in the liver, are glycoproteins that rely on Vitamin K to maintain normal hemostasis and play a crucial role in the body's anticoagulant system. Their deficiency leads to uncontrolled thrombin generation and thromboembolism.

Protein S (PS) was discovered in 1977 and functions as a multifunctional protein in blood coagulation, inflammation, and cellular processes. It inhibits procoagulants and acts as a cofactor for anticoagulants. PS also interacts with C4b binding protein to reduce inflammation. Protein C, which is also referred to as autoprothrombin IIA, is a type of zymogen that functions as an inactive enzyme. In its activated state, it plays a crucial role in regulating anticoagulation, inflammation, and cell death, as well as maintaining the permeability of blood vessel walls in both humans and other animals. The primary mechanism by which activated protein C (APC) accomplishes these functions is through the proteolytic inactivation of proteins Factor Va and Factor VIIIa [31].

The lentivirus human immunodeficiency virus (HIV) causes AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) by affecting numerous cells in the body and escaping the host immune system. AIDS is a life-threatening issue with a high morbidity and mortality rate, so it has attracted tremendous attention worldwide. In 2012, approximately 34 million people were infected with HIV worldwide [6, 9, 10, 19]. Furthermore, 37.9 million (38.4 to 43.8 million) people were living with HIV at the end of 2021, and WHO reported an estimated 53,000 cases of infection in Iran, with a range of 38 000 to 140 000 [11, 13]. HIV infection is primarily transmitted through blood and genital fluids. Then it enters the cell by interacting with CD4 and some other cellular receptors, and then the intracellular mechanisms determine if the infection is going to be latent or productive. The landscape of HIV infection has completely changed through antiretroviral therapy. The use of multiple drugs that act on different viral targets is known as highly active antiretroviral therapy (HAART). Such therapies mostly act by controlling viral replication of the virus, restoration of the immune system damage, and attenuating the complications associated with immunodeficiency. As a consequence of taking medication, life expectancy has increased in infected cases, and AIDS-related illnesses are no longer the primary threat. Nevertheless, the emergence of a new set of implications leads to several chronic conditions that may last for several decades [7, 21, 29]. Among these are chronic complications and hypercoagulable state resulting in thrombosis, which is a serious clinical issue in HIV-infected patients. A growing body of evidence has proved the association between HIV infection and prothrombic conditions. According to epidemiological studies, the incidence of thrombosis in PLHIV was estimated to be 2.6 people per year, and VTE occurrence among them ranges from 0.19% to 7.63% per year [28]. The prevention and treatment of venous thromboembolism (VTE) are gaining attention because of an increase in frequency and cost. Furthermore, VTE is a potentially preventable disease that is of most importance to identifying individuals in high-risk populations who may benefit from primary thromboprophylaxis [5].

Thromboembolism in HIV-infected patients: Hypercoagulable state and VTE are multifactorial, and the type and number of risk factors involved determine the severity of the condition. Several specific risk factors are thought to be associated with VTE in HIV-infected patients. Protein S deficiency is the

most prevalent coagulation abnormality in HIV-infected cases and its prevalence is reported to range from 27% to 76%. Protein S deficiency in HIV cases is a multifactorial state and can be caused as a result of decreased synthesis by the endothelial cells, hepatocytes, megakaryocytes, and the antibodies against protein S. Protein C Deficiency prevalence among HIV cases also ranges from 0 to 14% and can be mostly caused as a result of altered synthesis, altered metabolism, and low-grade disseminated intravascular coagulation (DIC). Antiphospholipid and lupus anticoagulant antibodies, antithrombin deficiency, and mild to moderate Hyperhomocysteinemia are among other important factors of hypercoagulable state in HIV-infected cases [2, 5, 24, 27].

Materials and methods

Study subjects and samples. This was a descriptive-analytical cross-sectional study conducted from 2020 to 2021. 100 patients were randomly selected among those who were admitted to the center. Demographic and clinical data, including age, height, marital status, number of children, job, education, the history of smoking, alcohol consumption, drug users, receiving blood, taking medications, taking immunosuppressive drugs, HAART treatment, stage of the disease, hepatitis B and C, HBV vaccination, and the history of any malignancy and opportunistic infection, were gathered using a questionnaire. The family history of thrombosis was also collected.

Sample collection. 10 ml of venous blood was drawn from each of the participants by venipuncture; 3 ml into a K3-EDTA Vacutainer tube, 3 ml in citrated (to separate plasma), and 4 ml in a coagulated tube to separate the serum. The tubes were allowed to clot, and serum was obtained by centrifuging it at 3000 revolutions per minute (rpm).

CD4 count and viral load measurement. Patients were identified based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). First, an ELISA was conducted for diagnosis, and confirmation was obtained by western blotting and PCR methods. CD4 analysis was also performed using standard flow cytometry techniques (PARTEC, Germany). HIV viral load was also quantified in all 100 cases by real-time PCR.

Measurement of proteins C and S concentrations and biomarkers. The laboratory tests, including FBS, Bun, creatinine, CBC, LFT, PT, PTT, HCV Ab, HbsAg, Toxoplasmosis infection, PPD, cholesterol, HDL, and LDL, were performed on PLHIV. Proteins S and C activities, as the main parameters of this study, were quantitatively measured using the ACL TOP system. Proteins C and S activities as an expected value in the HemosIL kit were reported 70% to 140% and 60% to 150%, respectively.

Statistical analysis. Data analysis was performed using descriptive statistics. Quantitative independent variables were presented as mean±standard deviation, and qualitative variables were described in terms of number and percentage. To determine the factors associated with proteins S and C, linear regression analysis was used. First, simple linear regression analysis was used to determine the factors associated with proteins S and C, and then the variables which were $p \leq 0.2$ in the simple analysis were entered into the multiple linear regression model. Data were analyzed by SPSS software version 22 and Graph Pad Prism software version 8. Also, p-value < 0.05 was considered a statistically significant level.

Ethical consideration. The study was also reviewed and approved with the approval of the ethical number IR.SUMS.Rec.1394.S538.

Results

A total of 100 PLHIV were enrolled, whose average age was 38.33±11.16 years and the gender of 59.0% male. 49.0% of patients were smokers, 47.0% were drug users, and 47.0% were injecting drug users. The mean CD4 cell count was 418.51±261.21 cells/mL, and 68.0% of patients had CD4 lower than 500 cells/mL. Also, 86.0% of patients were on HAART treatment, and 92% of patients had protein S over 60, and 90 patients had protein C over 70. Demographic characteristics and frequency of clinical variables of PLHIV by the category of proteins S (over 60 and under 60) and C (over 70 and under 70) are indicated in Table 1.

As shown in Table 2, independent variables, including RBC ($p = 0.019$), HB ($p = 0.040$), HCT ($p = 0.009$), FBS ($p = 0.004$), and ALB ($p = 0.023$), were directly related to protein S, which is confirmed by the univariate analysis. Also, the patient with positive VDRL ($p = 0.004$) significantly had a lower level of protein S. There was no significant association of protein S with smoking, taking drugs, and drug injection status.

In a simple analysis, drug users (drug user vs no drug user; $p = 0.001$) and injecting drug users (injecting drug users vs no injecting drug users; $p = 0.001$) significantly had a lower level of protein C. In the patients on HAART treatment ($p = 0.039$) and those with positive VDRL ($p = 0.020$), protein C was significantly higher. CD4, PT, and cholesterol were directly related to protein C. Patients with positive HCV significantly had a lower level of protein C. Furthermore, SGOT and HCV Ag were indirectly related to protein C (Table 3).

The level of protein S in the subgroups of smoking, taking drugs, and drug injection status has been shown in Figure 1, which shows that there had been no significant difference in the amount of protein S between the subgroups. Moreover, Figure 2 displays the level of protein C in the subgroups of smoking, taking drugs, and drug injection, and there was a significant difference in the amount of protein C between the subgroups.

Table 1. Characteristics of HIV patients by protein S and C status

Variables	Total (n = 100)	Protein S		Protein C	
		Higher than 60 (n = 92)	Under than 60 (n = 8)	Higher 70 (n = 90)	Under than 70 (n = 10)
Age	38.33±11.16	38.88 ±10.99	34.25 ±13.00	38.43 ±10.80	39.20 ±14.73
Sex					
Male	59 (59.0)	53 (57.6)	6 (75.0)	53 (58.9)	4 (40.0)
Female	41 (41.0)	39 (42.4)	2 (25.0)	37 (41.1)	6 (60.0)
Education					
Primary or illiterate	22 (22.0)	20 (21.7)	2 (25.0)	21 (23.3)	1 (10.0)
Guidance school	45 (45.0)	42 (45.7)	3 (37.5)	39 (43.3)	6 (60.0)
High school	18 (18.0)	16 (17.4)	2 (25.0)	16 (17.8)	2 (20.0)
– diploma	9 (9.0)	8 (8.7)	1 (12.5)	8 (8.9)	1 (10.0)
– academic	6 (6.0)	6 (6.5)	–	6 (6.7)	–
BMI	22.88±6.33	22.76±6.36	24.17±6.19	22.97±6.44	22.01±5.38
Marital Status					
Never Married	26 (26.0)	24 (26.1)	2 (25.0)	26 (28.9)	7 (70.0)
Married	51 (51.0)	47 (51.1)	4 (50.0)	44 (48.9)	–
Widowed/Divorced	23 (23.0)	21 (22.8)	2 (25.0)	20 (22.2)	3 (30.0)
Smoking					
Yes	49 (49.0)	43 (43.5)	6 (75.0)	41 (45.6)	8 (80.0)
No	51 (51.0)	49 (56.5)	2 (25.0)	49 (54.4)	2 (20.0)
Drug abuser					
Yes	47 (47.0)	41 (44.6)	6 (75.0)	39 (43.3)	8 (80.0)
No	53 (53.0)	51 (55.4)	2 (25.0)	51 (56.7)	2 (20.0)
Type of drug (n = 47)					
traditional drugs	26 (55.3)	23 (56.1)	3 (50.0)	22 (56.4)	4 (50.0)
industrial and traditional drugs	21 (44.7)	18 (43.9)	3 (50.0)	17 (43.6)	4 (50.0)
Iv drug user					
Yes	47 (47.0)	41 (44.6)	6 (75.0)	39 (43.3)	8 (80.0)
No	53 (53.0)	51 (55.4)	2 (25.0)	51 (56.7)	2 (20.0)
Blood transfusion					
Yes	2 (2.0)	2 (2.2)	–	2 (2.2)	–
No	98 (98.0)	90 (97.8)	8 (100.0)	88 (97.8)	10 (100.0)
HAART treatment					
Yes	86 (86.0)	79 (85.9)	7 (87.5)	79 (87.8)	7 (70.0)
No	14 (14.0)	13 (14.1)	1 (12.5)	11 (12.2)	3 (30.0)
AIDS stage					
1	2 (2.0)	2 (2.2)	–	2 (2.2)	–
2	6 (6.0)	6 (6.5)	–	5 (5.6)	1 (10.0)
3	2 (2.0)	1 (1.1)	1 (12.5)	1 (1.1)	1 (10.0)
4	90 (90.0)	83 (90.2)	7 (87.5)	82 (91.1)	8 (80.0)
HCV					
Yes	43 (43.0)	39 (42.4)	4 (50.0)	36 (40.0)	7 (70.0)
No	57 (57.0)	53 (57.6)	4 (50.0)	54 (60.0)	3 (30.0)
HCV treatment (n = 43)					
Yes	13 (30.2)	12 (30.8)	1 (25.0)	13 (36.1)	–
No	30 (69.8)	27 (69.2)	3 (75.0)	23 (63.9)	7 (100.0)
HBV					
Yes	1 (1.0)	1 (1.1)	–	–	–
No	99 (99.0)	91 (98.9)	8 (100.0)	90 (100.0)	10 (100.0)
HBV Vaccine					
Yes	94 (94.0)	86 (93.5)	8 (100.0)	85 (94.4)	9 (90.0)
No	6 (6.0)	6 (6.5)	–	5 (5.6)	1 (10.0)

Variables	Total (n = 100)	Protein S		Protein C	
		Higher than 60 (n = 92)	Under than 60 (n = 8)	Higher 70 (n = 90)	Under than 70 (n = 10)
Infectious disease					
Yes	1 (1.0)	1 (1.1)	–	–	–
No	99 (99.0)	91 (98.9)	8 (100.0)	90 (100.0)	10 (100.0)
Non-Infectious disease					
Yes	3 (3.0)	3 (3.3)	–	3 (3.3)	–
No	97 (97.0)	89 (96.7)	8 (100.0)	87 (96.7)	10 (100.0)
Opportunist					
Yes	–	–	–	–	–
No	100 (100.0)	92 (100.0)	8 (100.0)	90 (100.0)	10 (100.0)
WBC (× 1000/µl)	5.69±1.88	5.68±1.92	5.71±1.47	5.65±1.94	6.04±1.29
Lymph (%)	2.09±0.85	2.06±0.81	2.41±1.25	2.09±0.87	0.08±0.64
CD4 (cells/µl)	418.51±261.21	416.27±257.76	444.5±316.8	423.3±267.12	375.4±206.3
PT (s)	12.92±0.75	12.9±0.74	12.76±0.87	12.92±0.74	12.65±0.85
PTT (s)	30.86±3.34	30.7±3.32	31.8±3.59	30.7±3.29	31.5±3.79
RBC (× 1 000 000/µl)	8.40±0.82	4.43±0.87	4.13±0.44	4.38±0.82	4.58±0.81
HB (g/dl)	13.91±4.86	13.85±1.87	14.63±1.64	13.9±1.92	13.93±1.16
HCT (%)	42.03±4.83	42.3±1.93	42.2±3.24	41.99±4.95	42.3±3.68
FBS (mg/dl)	95.78±21.91	95.8±22.1	95.1±20.4	95.5±22.7	98.0±13.14
BUN (mg/dl)	14.25±15.73	14.2±16.3	14.45±6.32	14.29±16.53	13.86±4.3
Crea (mg/dl)	0.96±0.18	0.95±0.17	1.05±0.3	0.95±0.17	1.03±0.29
AST (U/L)	33.82±25.33	33.9±26.2	32.7±9.42	33.3±25.8	38.1±20.7
ALT (U/L)	38.63±26.35	37.6±25.4	49.8±35.1	37.9±25.4	44.5±34.6
ALK (U/L)	270.14±149.84	267.6±141.2	299.2±238.6	262.3±149.9	340.8±136.1
ALB (g/dl)	4.27±0.45	4.27±0.45	4.22±0.45	4.27±0.45	4.23±0.44
T.P (g/dl)	7.62±0.63	7.65±0.63	7.32±0.53	7.61±0.61	7.71±0.77
TG (mg/dl)	135.45±66.02	134.9±65.8	141.1±79.14	135.7±68.7	132.7±43.8
CHO (mg/dl)	167.22±58.51	169.1±60.1	145.8±28.74	166.1±57.4	178.0±69.9
U/RBC	1.13±0.56	1.14±0.58	1.14±0.58	1.13±0.58	1.1±0.31
U/WBC	1.09±0.47	1.08±0.48	1.12±0.35	1.1±0.49	1.0±0.0
HIV Viral load (copy/ml)	99 165.07± 325 479.11	85 758.0± 273 238.0	253 444.6± 705 792.0	107 329.3± 341 969.0	25 687.0± 46 925.0
VDRL					
Yes	1 (1.0)	1 (1.1)	–	1 (1.1)	–
No	99 (99.0)	91 (98.9)	8 (100.0)	89 (98.9)	10 (100.0)
TOXO (Iu/ml)					
Yes	1 (1.0)	1 (1.1)	–	1 (1.1)	–
No	99 (99.0)	91 (98.9)	8 (100.0)	89 (98.9)	10 (100.0)
PPD					
Positive	–	–	–	–	–
Negative	100 (100.0)	92 (100.0)	8 (100.0)	90 (100.0)	10 (100.0)
HIV time infectious (years)	11.44±21.60	11.07±22.5	8.37±2.97	9.82±13.87	25.9±54.20
PLT (× 1000/µl)	236.87±89.30	236.7±91.5	238.6±63.1	236.01±90.7	244.6±79.4
HDL (mg/dl)	36.47±6.31	36.2±6.41	38.5±4.78	36.4±5.92	36.9±9.5
LDL (mg/dl)	82.72±20.42	89.9±20.7	69.25±9.28	83.11±19.04	79.3±29.15

Notes. Data reported as N (%), mean ±SD. BMI: Body Mass Index; HAART: high active antiretroviral therapy; HCV: Hepatitis C Virus; AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome; HBV: Hepatitis B Virus; WBC: White Blood Cell × 1000/µl; PT: Prothrombin time; PTT: Partial Thromboplastin time; RBC: Red Blood Cell; HB: Hemoglobin; HCT: Hematocrit; FBS: Fasting Blood Sugar; BUN: Blood Urea Nitrogen; Crea: Creatinine; AST: Aspartate Trans Aminase; ALT: Alanine Trans Aminase; ALK: Alkaline phosphatase; ALB: Albumin; T.P: Total Protein; TG: Triglyceride; Cho: Cholesterol; U/RBC: Urine RBC; U/WBC: Urine WBC; TOXO: Toxoplasma gundi Ig G; PPD: Protein Purified derivative; PLT: Platelets count; HDL: High-density Lipoprotein; LDL: low-density Lipoprotein; Iv: Intravenous.

Table 2. Factors related to protein S in patients with HIV: univariate analysis

Variables	B	SE	P-value
Age	0.11	0.28	0.706
Sex			
Female	Ref	–	–
Male	6.21	6.35	0.330
Smoking			
No	Ref	–	–
Yes	–0.06	0.49	0.897
Drug abuser			
No	Ref	–	–
Yes	–5.35	6.34	0.401
Iv drug user			
No	Ref	–	–
Yes	–4.52	6.33	0.478
Blood transfusion			
No	Ref	–	–
Yes	–2.93	22.12	0.895
HAART treatment			
No	Ref	–	–
Yes	0.67	8.95	0.940
AIDS stage	2.87	4.89	0.559
HCV			
No	Ref	–	–
Yes	5.95	6.38	0.353
CD4 (cells/µl)	0.01	0.01	0.531
HIV Viral load (copy/ml)	–5.28	0.01	0.581
VDRL			
No	Ref	–	–
Yes	88.62	29.58	0.004*
RBC (× 1000000/µl)	9.05	3.78	0.019*
HB (g/dl)	3.57	1.71	0.040*
HCT (%)	1.71	0.64	0.009*
FBS (mg/dl)	0.39	0.13	0.004*
Creatinine (mg/dl)	–28.35	16.54	0.090
ALB (g/dl)	15.53	6.74	0.023*

Note. *Significant at 0.05 level.

Table 3. Factors related to protein C in patients with HIV: a multivariate analysis

Variables	B	SE	P-value
Age	–0.03	0.28	0.889
Sex			
Female	Ref	–	–
Male	–12.11	6.41	0.062
Smoking			
No	Ref	–	–
Yes	–20.39	6.09	0.001*
Drug abuser			
No	Ref	–	–
Yes	–20.39	6.10	0.001*
Iv drug user			
No	Ref	–	–
Yes	–21.26	6.07	0.001*
Blood transfusion			
No	Ref	–	–
Yes	–18.78	22.78	0.41
HAART treatment			
No	Ref	–	–
Yes	18.91	9.03	0.039*
AIDS stage	6.32	5.02	0.211
HCV			
No	Ref	–	–
Yes	–17.26	6.26	0.007*
CD4 (cells/µl)	0.03	0.01	0.017*
HIV Viral load (copy/ml)	–9.97	0.01	0.313
VDRL			
No	Ref	–	–
Yes	74.44	31.43	0.020*
PT (s)	9.57	4.18	0.024*
Creatinine (mg/dl)	–30.29	16.68	0.073
SGOT (U/L)	–0.61	0.18	0.001*
SGPT (U/L)	–0.20	0.12	0.111
ALK (U/L)	–0.03	0.02	0.141
ALB (g/dl)	13.58	7.02	0.056
TG (mg/dl)	0.08	0.05	0.082
Cholesterol (mg/dl)	0.14	0.05	0.011*
HCV Ag	–17.48	6.36	0.007*
Cervical	22.06	8.81	0.014*

Note. *Significant at 0.05 level.

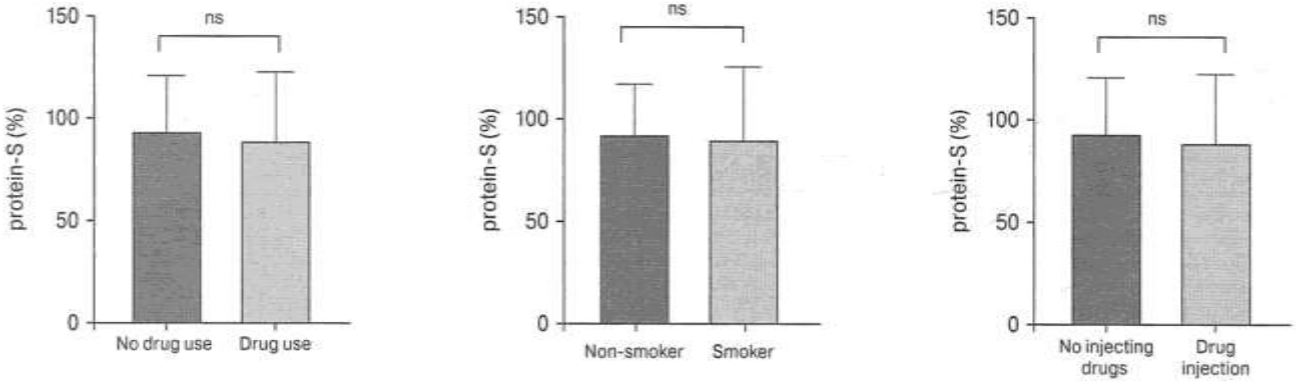


Figure 1. Protein S in subgroup of smoking, taking drugs and drug injection status

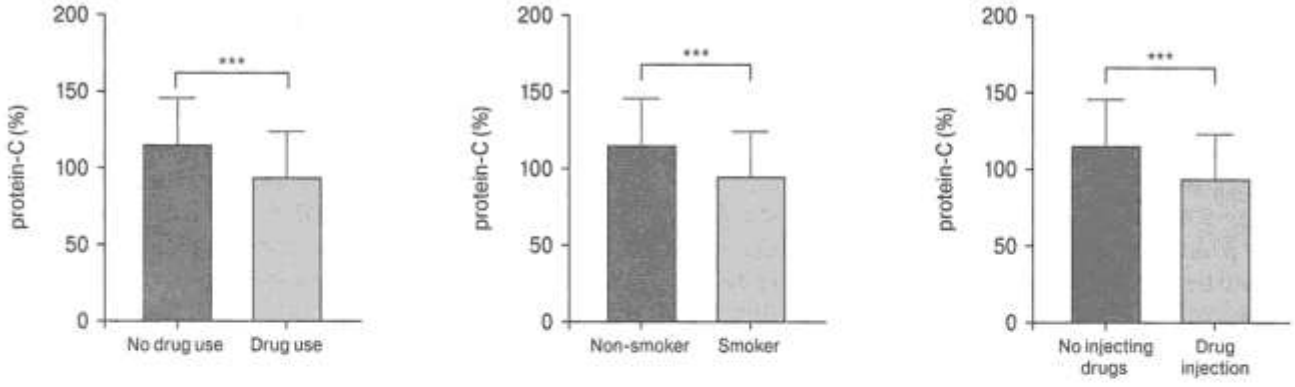


Figure 2. Protein C in subgroup of smoking, taking drugs and drug injection status

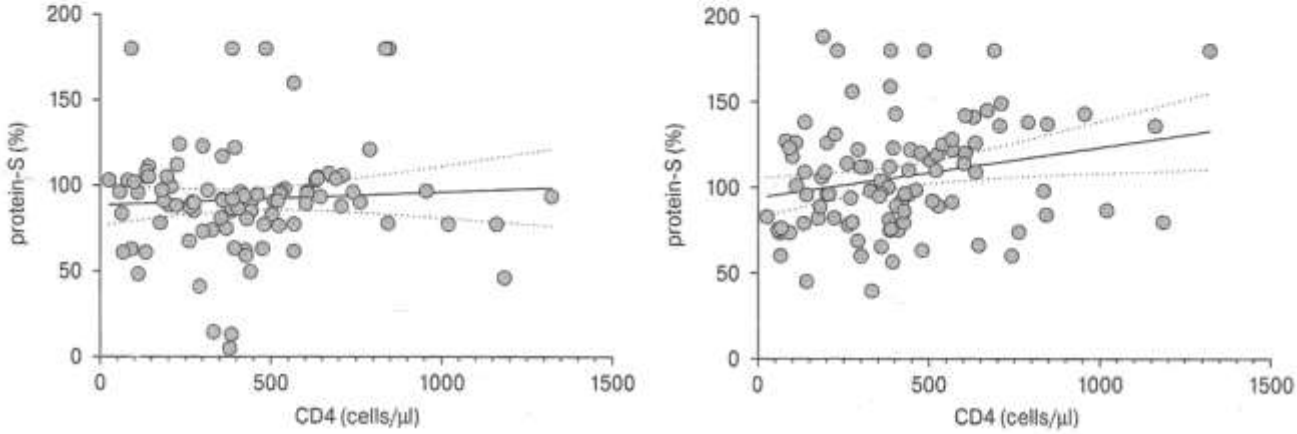


Figure 3. Correlation between CD4 and protein S and protein C

Discussion

The human immunodeficiency virus (HIV) may lead to different hematological manifestations. Thrombotic events seem to be more common among HIV-infected cases in comparison with the general population. Several studies have been performed to assess the inflammatory/hypercoagulable state in HIV-infected cases [12], and there are many reasons which answer why it is clinically very crucial to shed light on the mechanisms through which hypercoagulable conditions are developed in HIV cases. The most important reason to mention is that hypercoagulable complications predispose to the development of deep venous thrombosis, pulmonary embolism, and arterial thrombosis, which are potentially life-threatening [15, 23, 25]. For example, the risk of venous thrombotic events has been reported to be 6.5 to 10 times more prevalent in HIV cases than in normal populations [1].

The results of this study revealed that 8% of our HIV cases had protein S deficiency (less than 60), and 10% of them had a less than 70 protein C level. Proteins S and C are key factors in determining the coagulative status of PLHIV, and a growing body of literature has demonstrated their deficiency in PLHIV. Therefore, the following study aimed to assess biochemical, hematological, infectious, and demographic factors of PLHIV regarding their proteins S and C status (protein S sufficiency vs protein S deficiency, and protein C sufficiency vs protein C deficiency). The correlation between proteins S and C levels was also analyzed in drug users vs non-drug users, smokers vs non-smokers, and those cases receiving HAART therapy. According to our results, RBC, Hb, HCT, FBS, and ALB were directly related to protein S level, and the patients with positive VDRL significantly had a lower level of protein S. In addition, it is shown that drug users and injecting drug users significantly had a lower level of protein C. Data analysis also revealed that patients receiving HAART therapy and patient with positive VDRL had a higher level of protein C. CD4 count, PT, and cholesterol had a direct correlation with protein C (Fig. 3). Patients with positive HCV significantly had a lower level of protein C. Furthermore, SGOT and HCV Ag were indirectly related to protein C.

Increased platelet activation, elevated homocysteinemia, elevated plasma factor VII activity, lupus anticoagulant, activated protein C resistance, protein C

deficiency, and acquired protein S deficiency are the main reported causes of thrombophilia in HIV-infected cases. In a study by Erbe et al. in 2003, the incidences of proteins S and C deficiencies were 67% and 25% in acutely ill patients, respectively [8]. A study of protein S deficiency among 25 randomly-selected HIV-seropositive men demonstrated protein S deficiency in 19 subjects (76%), which was a statistically significant result compared to healthy male controls [26]. In a study conducted by Bibas et al. in 2011, protein S deficiency was reported to be prevalent in 27% to 76% of HIV cases [5]. In 2018, Khare et al. studied the coagulation abnormalities in HIV-infected patients by detecting certain prothrombotic factors in 30 HIV-infected subjects, and the results revealed that levels of hemoglobin, CD4 counts, platelet counts, mean platelet volume, and proteins C and S activities were significantly lower in HIV-seropositive patients compared to the healthy individuals [12].

Hematologic disorders are known as the most common observed complications of PLHIV. These hematologic abnormalities are also more pronounced during the late stages of the disease. Therefore, they imply on progressive nature of HIV. Anemia is a common finding and has been reported in 63% to 95% of patients. Its incidence increases with disease development. According to Bhardwaj et al., Hemoglobin, RBC, neutrophil, and platelet count are lower in HIV cases, and these abnormalities are more severe in those cases with a CD4 count of fewer than 200 cells/ul [4, 30]. In the following study, the results implicated the correlation of Hb, HCT, and RBC count with protein S level.

Liver dysfunction is extensively observed in PLHIV, and LFT abnormalities have been reported in around 50% of them. Elevated liver enzymes in HIV can be secondary to co-infection with hepatitis viruses, lipid-lowering drugs, alcoholism, and direct inflammation in hepatocytes [20]. Aspartate aminotransferase (SGOT) and alanine aminotransferase (SGPT) are among the first indicators of hepatocellular injury. In 2009, a study conducted by Mata Marin et al. revealed a direct correlation between HIV viral load and alanine aminotransferase (SGPT) [16]. The findings indicate an indirect correlation between protein C and SGOT enzyme. Hypoalbuminemia has also been previously reported in 5.9% to 39.5% of HIV cases, and it can be linked to factors, including nutrition, inflammatory response, and renal and hepatic function [14]. Serum albumin level is shown to be elevated after antiviral therapies. The results also revealed a correlation between albumin level and protein S. Fasting blood sugar also is indicated to be related to protein S status.

Serum lipid profile alterations have been reported in HIV cases in several studies. Mondy K. et al. observed the decreased dense lipoprotein (HDL) and increased triglyceride (TG) in their study group in the US. Some reports also imply elevated total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), and TG in Uganda [17]. In a study conducted by Adewole et al., elevated LDL and reduced levels of HDL and TC were observed compared with HIV negative controls. The findings revealed a correlation between protein C and TC level. HDL and LDL were highly associated with the atherothrombotic processes. Purified HDL contributes to factor Va inactivation by activated protein C (APC) [3]. Proteins C and S are also involved in thrombin downregulation. In vivo studies have demonstrated that HDL enhances the anticoagulant protein C pathway.

HCV infection stands for nearly 75% of liver-related death in HIV cases, and around 25% of HIV cases in Europe and the USA suffer from HCV co-infection. The evaluation of the fact that HCV infection affects HIV progression is still a matter of debate. HCV infection is reported in approximately 15% to 30% of people with HIV, and HIV-HCV co-infection is prevalent in 90% of the cases whose HIV is caused due to drug injection. HCV-HIV co-infection accelerates life damage which consequently leads to cirrhosis [18, 22]. According to the results, PLHIV with cirrhosis significantly had a lower protein C level. This may be caused secondarily to reduce the synthesis of this protein in the hepatocytes.

According to our results, protein C is substantially lower in drug users. Several studies have demonstrated that the drugs such as methamphetamine (METH), cocaine, and alcohol are involved in triggering inflammation and are directly related to the concentration of acute-phase proteins like CRP. Although protein C is characterized as an acute-phase protein, the results imply the reduced concentration of this factor in HIV cases who are drug users.

The viral load was 25 687 copy/ml and 107 329 copy/ml in protein C deficient and protein C sufficient cases, respectively. The result was statistically significant (p-value: 0.02). This finding is kind of new and it is recommended to evaluate the correlation between protein C and viral load in more HIV cases and larger sample sizes.

Conclusion

HIV-infected adults are more likely to develop hemostatic imbalance and coagulation abnormalities. According to the findings, there is an urge to pay special attention to thromboembolic diseases. It is important to do a differential diagnosis when a patient who is HIV-positive doesn't show any signs of thromboembolic disease. Further research with a higher sample size is required to confirm our results. Additionally, assessment of coagulation disorders in HIV-infected cases along with other markers and risk factors may be helpful in disease monitoring and management.

Acknowledgment

First, we are thankful to all PLHIV for their kind collaboration. We would appreciate Deputy for Research of Shiraz University of Medical Sciences for its all support. Also, we would extend our appreciation to all staff of the Voluntary, Counseling, and Testing Center (VCT) of Fars province for their cooperation in this study.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

1. Abdollahi A., Shoar T.S. Hyperhomocysteinemia in HIV-infected individuals: correlation of a frequent prothrombotic factor with CD4+. *Cell Count. Oman Med. J., 2012, vol. 27, no. 3, pp. 224–227. doi: 10.5001/omj.2012.50*
2. Aboulafia D.M. An update on HIV-associated venous thromboembolism in the era of highly active antiretroviral therapy. *The Journal of Coagulation Disorders, 2010, vol. 2, no. 2: p. 1–8.*
3. Adewole O.O., Eze S., Betiku Ye, Anteyi E., Wada I., Ajuwon Z., Erhabor G. Lipid profile in HIV/AIDS patients in Nigeria. *African Health Sciences, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 144–149.*
4. Bhardwaj S., Almaeen A., Ahmed Wani F., Thirunavukkarasu A. Hematologic derangements in HIV/AIDS patients and their relationship with the CD4 counts: a cross-sectional study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol., 2020, vol. 13, no. 4, pp. 756–763.*
5. Bibas M., Biava G., Antinori A. HIV-associated venous thromboembolism. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis., 2011, vol. 3, no. 1: e2011030. doi: 10.4084/MJHID.2011.030*
6. Deeks S.G., Lewin S.R., Havlir D.V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet, 2013, vol. 382, no. 9903, pp. 1525–1533. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61809-7*
7. Deeks S.G., Lewin S.R., Ross A.L., Ananworanich J., Benkirane M., Cannon P., Chomont N., Douek D., Lifson J.D., Lo Y.R., Kuritzkes D., Margolis D., Mellors J., Persaud D., Tucker J.D., Barre-Sinoussi F.; International AIDS Society Towards a Cure Working Group; Alter G., Auerbach J., Autran B., Barouch D.H., Behrens G., Cavazzana M., Chen Z., Cohen É.A., Corbelli G.M., Eholié S., Eyal N., Fidler S., Garcia L., Grossman C., Henderson G., Henrich T.J., Jefferys R., Kiem H.P., McCune J., Moodley K., Newman P.A., Nijhuis M., Nsubuga M.S., Ott M., Palmer S., Richman D., Saez-Cirion A., Sharp M., Siliciano J., Silvestri G., Singh J., Spire B., Taylor J., Tolstrup M., Valente S., van Lunzen J., Walensky R., Wilson I., Zack J. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat. Med., 2016, vol. 22, no. 8, pp. 839–850. doi: 10.1038/nm.4108*
8. Erbe M., Rickerts V., Bauersachs R.M., Lindhoff-Last E. Acquired protein C and protein S deficiency in HIV-infected patients. *Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2003, vol. 9, no. 4, pp. 325–331. doi: 10.1177/107602960300900408*
9. Hall H.I., An Q., Tang T., Song R., Chen M., Green T., Kang J.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of diagnosed and undiagnosed HIV Infection — United States, 2008–2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep., 2015, vol. 64, no. 24, pp. 657–662.*
10. Ifeanyi O.E., Amilo G.I., Uzoma O.G., Nnatuanya I.N. Human Immunodeficiency Virus infection and cardiovascular disease. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci., 2017; 3(9): 9-37. doi: 10.22192/ijcrms.2017.03.09.002*
11. Joulaei H., Lankarani K.B., Kazerooni P.A., Marzban M. Number of HIV-infected cases in Iran: True or just an iceberg. *Indian J. Sex. Transm. Dis. AIDS, 2017, vol. 38, no. 2, pp. 157–162. doi: 10.4103/2589-0557.216984*
12. Khare S., Kushwaha R., Kumar A., Venkatesh V., Reddy H.D., Jain M., Yusuf M., Singh U.S. Prothrombotic state in HIV: a study on protein C, protein S, homocysteine and correlation with CD4 counts. *Indian J. Med. Microbiol., 2018, vol. 36, no. 2, pp. 201–206. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_15_414*
13. Khodayari-Zarnaq R., Mosaddeghrad A.M., Nadrian H., Kabiri N., Ravaghi H. Comprehensive analysis of the HIV/AIDS policy-making process in Iran. *Health Res. Policy Syst., 2019, vol. 17, no. 1: 69. doi: 10.1186/s12961-019-0466-6*
14. Leal J.A., Fausto M.A., Carneiro M., Tubinambás U. Prevalence of hypoalbuminemia in outpatients with HIV/AIDS. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2018, vol. 51, no. 2, pp. 203–206. doi: 10.1590/0037-8682-0093-2017*
15. Majluf-Cruz A., Silva-Estrada M., Sánchez-Barboza R., Montiel-Manzano G., Treviño-Pérez S., Santoscoy-Gómez M., de Chávez-Ochoa A.R., Corona-de la Peña N., Nieto-Cisneros L. Venous thrombosis among patients with AIDS. *Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2004, vol. 10, no. 1, pp. 19–25. doi: 10.1177/107602960401000104*
16. Mata-Marín J.A., Gaytán-Martínez J., Grados-Chavarría B.H., Fuentes-Allen J.L., Arroyo-Anduiza C.I., Alfaro-Mejía A. Correlation between HIV viral load and aminotransferases as liver damage markers in HIV infected naive patients: a concordance cross-sectional study. *Virol. J., 2009, vol. 6: 181. doi: 10.1186/1743-422X-6-181*
17. Mondy K.E., Gottdiener J., Overton E.T., Henry K., Bush T., Conley L., Hammer J., Carpenter C.C., Kojic E., Patel P., Brooks J.T.; SUN Study Investigators. High prevalence of echocardiographic abnormalities among HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis., 2011, vol. 52, no. 3, pp. 378–386. doi: 10.1093/cid/ciq066*
18. Ng K.T., Takebe Y., Chook J.B., Chow W.Z., Chan K.G., Abed Al-Darraji H.A., Kamarulzaman A., Tee K.K. Co-infections and transmission networks of HCV, HIV-1 and HPgV among people who inject drugs. *Sci. Rep., 2015, vol. 5: 15198. doi: 10.1038/srep15198*
19. Patel P., Raizes E., Broyles L.N. Human immunodeficiency virus infection. In: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 10th ed. *Elsevier, 2020, pp. 232–266. doi: 10.1016/b978-0-323-55512-8.00031-4*
20. Pathania S., Kaur N., Kumar S., Sashindran V.K., Puri P. A cross-sectional study of liver function tests in HIV-infected persons in Western India. *Med. J. Armed Forces India, 2017, vol. 73, no. 1, pp. 23–28. doi: 10.1016/j.mjafi.2016.12.004*
21. Rezaei E., Sedigh Ebrahim-Saraie H., Heidari H., Ghane P., Rezaei K., Manochehri J., Moghadami M., Afsar-Kazerooni P., Hassan Abadi A.R., Motamedifar M. Impact of vitamin supplements on HAART related hematological abnormalities in HIV-infected patients. *Med. J. Islam. Repub. Iran, 2016, vol. 30: 350.*

22. Salmon-Ceron D., Nahon P., Layese R., Bourcier V., Sogni P., Bani-Sadr F., Audureau E., Merchadou L., Dabis F., Wittkop L., Roudot-Thoraval F.; ANRS CO12 CirVir and ANRS CO13 HEPAVIH study groups. Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus (HCV) Co-infected patients with cirrhosis are no longer at higher risk for hepatocellular carcinoma or end-stage liver disease as compared to HCV mono-infected patients. *Hepatology, 2019, vol. 70, no. 3, pp. 939–954. doi: 10.1002/hep.30400*
23. Shen Y.M., Frenkel E.P. Thrombosis and a hypercoagulable state in HIV-infected patients. *Clin. Appl. Thromb. Hemost., 2004, vol. 10, no. 3, pp. 277–280. doi: 10.1177/107602960401000311*
24. Singh A.K., Premnath D., Yadav K.S. Human immunodeficiency virus-associated deep vein thrombosis. *Med. J. DY Patil. Univ., 2016, vol. 9, pp. 98–100. doi: 10.4103/0975-2870.167967*
25. Soentjens P., Ostyn B., Van Outryve S., Ysebaert D., Vekemans M., Colebunders R. Portal vein thrombosis in a patient with HIV treated with a protease inhibitor-containing regimen. *Acta Clin. Belg., 2006, vol. 61, no. 1, pp. 24–29. doi: 10.1179/acb.2006.005*
26. Stahl C.P., Wideman C.S., Spira T.J., Haff E.C., Hixon G.J., Evatt B.L. Protein S deficiency in men with long-term human immunodeficiency virus infection. *Blood, 1993, vol. 81, no. 7, pp. 1801–1807. doi: 10.1182/blood.v81.7.1801.1801*
27. Sule A.A., Pandit N., Handa P., Chadachan V., Tan E., Sum F.N., Joyce E.H., Chin T.J. Risk of venous thromboembolism in patients infected with HIV: a cohort study. *Int. J. Angiol., 2013, vol. 22, no. 2, pp. 95–100. doi: 10.1055/s-0033-1333866*
28. Sullivan P.S., Dworkin M.S., Jones J.L., Hooper W.C. Epidemiology of thrombosis in HIV-infected individuals. The adult/adolescent spectrum of HIV disease project. *AIDS, 2000, vol. 14, no. 3, pp. 321–324. doi: 10.1097/00002030-200002180-00015*
29. Vanhamel J., Bruggemans A., Debyser Z. Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? *J. Virus Erad., 2019, vol. 5, no. 1, pp. 3–9. doi: 10.1016/s2055-6640(20)30275-2*
30. Volberding P.A., Baker K.R., Levine A.M. Human immunodeficiency virus hematology. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program, 2003, pp. 294–313. doi: 10.1182/asheducation-2003.1.294*
31. Wypasek E., Undas A. Protein C and protein S deficiency — practical diagnostic issues. *Adv. Clin. Exp. Med., 2013, vol. 22, no. 4, pp. 459–467.*

Авторы:
Резаи Э., PhD, зав. лабораторией центра исследования ВИЧ, кафедра биохимии, факультет биологических наук, Университет Тарбиат Модарес, Тегеран, Иран;
Джамали Э., магистр иммунологии, Пейвандская лаборатория патобиологии и генетики, г. Шираз, Иран;
Форузанфар З., PhD, исследователь в области ВИЧ, Ширазский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Институт здравоохранения Ширазского университета медицинских наук, г. Шираз, Иран;
Атаиб Ф., доцент кафедры биохимии, факультет биологических наук, Университет Тарбиат Модарес, Тегеран, Иран;
Бехешти Ш., доцент, специалист по инфекционным заболеваниям, Ширазский научно-исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Институт здравоохранения Ширазского университета медицинских наук, г. Шираз, Иран
Джулаи Х., PhD, руководитель исследовательского центра ВИЧ, доцент, специалист по организации здравоохранения, Ширазский исследовательский центр ВИЧ/СПИДа, Институт здравоохранения Ширазского университета медицинских наук, г. Шираз, Иран.

Authors:
Rezaei E., PhD, Head of HIV Research Center's Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran;
Jamali E., MSc of Science in Immunology, Peyvand Pathobiology and Genetic Laboratory, Shiraz, Iran;
Foroozanfar Z., PhD, Researcher, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran;
Ataei F., Associated Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran;
Beheshti S., Associated Professor of Infectious Diseases, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran;
Joulaei H., PhD, Head of HIV Research Center, Associate Professor of Public Health, Shiraz HIV/AIDS Research Center, Institute of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Поступила в редакцию 26.01.2023
Отправлена на доработку 16.03.2023
Принята к печати 23.06.2023

Received 26.01.2023
Revision received 16.03.2023
Accepted 23.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 559–566

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 559–566

POST-COVID-19 COMPLICATIONS IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS

M. Shafiekhani[a], S. Abolghasemi[b], M. Asgharpour[c], Z. Zare[a], H. Negahban[b], R. Akbari[d], H. Nikoupour[a], J. Roozbeh[a], F. Oliaie[d], Y. Yahyapour[d], Z. Geraili[d], M. Barari[d], S. Ebrahimpour[d], M. Baziboroun[b,d]

[a] *Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*
[b] *Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran*
[c] *Rouhani Hospital of Medical Sciences, Babol, Iran*
[d] *Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*

Abstract. *Background.* Although most people recover from acute COVID-19 within a few weeks, some have long-lasting clinical problems. The prevalence of these prolonged complications in kidney transplant (KT) recipients has not been determined. *Materials and methods.* Six months following of 148 patients with post-COVID-19 syndrome admitted to three centers in Iran (Tehran, Shiraz and Babol) that underwent KT were included in this study. Also, one-hundred COVID-19 patients without KT were included as the control group. The demographic data, medications, and disease course were recorded. The baseline and demographic characteristics were analyzed using the Chi-square test. Moreover, student's t-test were utilized to compare case and control groups. *Results.* The total number of patients was 248, of which 148 were in the case groups. Hospitalization associated with COVID-19 was for all patients; besides, there were 18 patients in control and 24 case groups admitted to an intensive care unit (ICU). The most commonly reported symptom was fever. Multivariate analysis identified the history of chronic kidney disease, hypertension, cerebral vascular accident, and diabetes mellites as predictors for developing post-COVID clinical complications. *Conclusion.* Evidence shows the high commonness of post-COVID-19 syndrome among kidney transplant patients after COVID-19, and the most common symptoms were fever, chills, and myalgia. So, all patients recovered from acute COVID-19 should undergo long-term monitoring to evaluate and treat possible complications.

Key words: *long-COVID-19, post-COVID-19, COVID-19, complications, kidney transplant, prolonged symptoms.*

ПОСТКОВИДНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ У РЕЦИПИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКИ

Шафихани М.[1], Аболгасеми С.[2], Асгарпур М.[3], Заре З.[1], Негабан Х.[2], Акбари Р.[4], Никупур Х.[1], Розбех Дж.[1], Олиайе Ф.[4], Яхьяпур Ю.[4], Джерайли З.[4], Барари М.[4], Эбрахимпур С.[4], Базиборун М.[2,4]

[1] *Ширазский университет медицинских наук, Шираз, Иран*
[2] *Университет медицинских наук им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран*
[3] *Больница медицинских наук Рухани, Баболь, Иран*
[4] *Бабольский университет медицинских наук, Баболь, Иран*

Резюме. *Введение.* Хотя большинство людей выздоравливают от острой формы COVID-19 в течение нескольких недель, у некоторых заболевание приобретает затяжное течение с разного рода клиническими проявлениями. Распространенность таких вариантов COVID-19 у людей, перенесших трансплантацию почки (ТП), не установлена. *Материалы и методы.* В исследование было включено 148 пациентов с постковидным синдромом, госпитализированных в три центра в Иране (Тегеран, Шираз и Баболь). За шесть месяцев до

Адрес для переписки:
Мана Базиборун
Иран, провинция Мазандаран, г. Баболь, б-р Кешаварз,
Бабольский университет медицинских наук.
Тел.: +989111153051.
E-mail: manabaziboron@gmail.com

Contacts:
Mana Baziboroun
Iran, Mazandaran, Babol, Keshavarz Boulevard,
Babol University of Medical Sciences
Phone: +989111153051.
E-mail: manabaziboron@gmail.com

Для цитирования:
Шафихани М., Аболгасеми С., Асгарпур М., Заре З., Негабан Х., Акбари Р., Никупур Х., Розбех Дж., Олиайе Ф., Яхьяпур Ю., Джерайли З., Барари М., Эбрахимпур С., Базиборун М. Постковидные осложнения у реципиентов трансплантированной почки // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 559–566. doi: 10.15789/2220-7619-PCC-7111

Citation:
Shafiekhani M., Abolghasemi S., Asgharpour M., Zare Z., Negahban H., Akbari R., Nikoupour H., Roozbeh J., Oliaie F., Yahyapour Y., Geraili Z., Barari M., Ebrahimpour S., Baziboroun M. Post-COVID-19 complications in kidney transplant recipients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 559–566. doi: 10.15789/2220-7619-PCC-7111

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PCC-7111

этого им была проведена ТП. Контрольную группу составили 100 пациентов с COVID-19 без предшествующей ТП. Были проанализированы демографические данные, использованные лекарственные препараты и течение болезни. Исходные и демографические характеристики оценивались с использованием критерия хи-квадрат. Кроме того, для сравнения групп случаев и контрольных групп использовался t-критерий Стьюдента. *Результаты.* Все пациенты с COVID-19, включая перенесших ТП и лиц контрольной группы, были госпитализированны, причем лечение на отделении интенсивной терапии (ОИТ) потребовалось 24 больным с ТП в анамнезе и 18 пациентам контрольной группы. Наиболее частым симптомом была лихорадка. Многофакторный анализ обнаружил наличие в анамнезе хронических заболеваний почек, артериальной гипертензии, инсульта и сахарного диабета, которые являлись предикторами развития клинических осложнений после COVID-19. *Выводы.* Данные показывают высокую распространенность постковидного синдрома среди пациентов с трансплантацией почки после COVID-19. Наиболее распространенными симптомами были лихорадка, озноб и миалгия. Таким образом, все пациенты, выздоровевшие от острого COVID-19, должны проходить длительное наблюдение для оценки их состояния и терапии возможных осложнений.

Ключевые слова: *long-COVID-19, post-COVID-19, COVID-19, осложнения, трансплантация почки, пролонгированные симптомы.*

Introduction

On February 19, 2020, Iran reported its first COVID-19 mortality; by December 2022, more than 140,000 deaths were reported by SARS-CoV-2 infection [22]. In severe cases, multiple organ failure threatens patients with possible damage to vital organs such as the lungs, heart, liver, nervous system, and kidneys [18]. A condition known as "post-acute COVID-19 syndrome" or "long COVID-19," lasting for weeks or months, was observed in some recovered patients over time that was frequently manifested as persistent neurological, respiratory, or cardiovascular symptoms [17]. Persistent symptoms, such as fatigue, diffuse myalgia, and arthralgia, characterize Post-COVID-19 syndrome. These symptoms are linked mainly to mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and low antioxidant levels [19]. Surprisingly, some patients with severe COVID-19 recover more quickly, whereas others with milder forms of the disease, or those who were asymptomatic, develop significant post-COVID-19 complications and require a long time to recover [24].

Immunocompromised patients may present with unusual symptoms after SARS-CoV-2 infection. Therefore, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) identify immunocompromised patients, including those requiring immunosuppressive treatment after organ transplantation, as high-risk groups at risk of becoming severely ill with SARS-CoV-2 [13]. Kidney transplantation (KT) is the ultimate treatment for end-stage renal disease (ESRD) patients. KT recipients (KTRs) are at high risk due to chronic immunosuppression and comorbidities.

A significant temporal relationship has been observed between the increase in the severity of COVID-19 infection and the increase in the mortality in solid organ transplant patients. This decline has been seen most in KT, even in regions with few cases of COVID-19 [14]. The European Union database stated that about 21% of deaths from COVID-19 between February 1, 2020, and May 1, 2020, were in KTRs. Risk factors in KTRs with COVID-19 are older age, more significant weakness, obesity, and previous lung disease [15]. In KTRs with COVID-19, fever, cough, respiratory failure, fatigue, myalgia, and gastrointestinal symptoms have been reported as the most common manifestations [10, 15].

Several medical facilities stopped all immunosuppressive regimens for KTRs with COVID-19 and replaced them with methylprednisolone. Despite a reduction and change in baseline immunosuppression, no transplant rejection was reported in any patients [15]. A systematic review examining KTRs with COVID-19 from Asia, Europe, and America reported that compared to patients with mild or moderate disease, patients with severe disease had higher C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase (LDH), ferritin, and D-dimer. Moreover, more prolonged time from transplantation to COVID-19 diagnosis, hypoxia, and elevated LDH were associated with higher mortality. Also, COVID-19 was associated with higher morbidity and mortality in KTRs. None of the specific COVID-19 treatments was associated with disease improvement in KTRs [11].

Little is known about the outcomes of COVID-19 infection and it's residual complications in KTRs. Thus, this study aimed to describe complications following COVID-19 in KTRs from three referral centers in Iran.

Materials and methods

Study design and participants. By the end of August 2022, we identified 148 adult KTRs with COVID-19 at Shahid Beheshti hospital of Babol (C1) (35 patients), Shahid Namazi hospital of Shiraz (C2) (63 patients), and Shahid Labafinezhad hospital of Tehran, Iran (C3) (50 patients). Another 100 patients with COVID-19 who did not undergo a KT were included in the study as the control group. Patients with two negative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) tests for SARS-CoV-2 were eligible for further follow-up at our outpatient clinics. Then, all included patients were followed up for six months. Ethical approval for this study was obtained from the ethics committee of Babol University of Medical Sciences (Reference code: IR.MUBABOL.HRI.REC.1401.086).

Procedures and questionnaires. Patients were interviewed with a standardized survey by an infectious dis-

ease specialist to recount symptoms during the acute illness and whether they persisted or some new occurred to assess clinical complications, such as dry cough, headache, fever, chills, myalgia, sore throat, sputum discharge, dyspnea, hemoptysis, chest pain, rhinorrhea, nasal congestion, nausea, and vomiting. Individually, other diagnostic procedures were employed (laboratory and radiologic). Patient information includes demographic data, prescribed medications, disease course, paraclinical assays, computed tomography (CT) scan, time of KT, and immunosuppressive medications, including azathioprine, mycophenolic acid, cyclosporine, sirolimus, and tacrolimus, the need for dialysis during hospitalization, and their final outcome were recorded via a standardized questionnaire.

Statistical analysis. The primary outcomes included the presence of clinical complications or the occurrence of laboratory abnormalities. Multiple logistic regression statistical tests will be used to investigate the relationship between hematological and biochemical variables and the occurrence of death. The results will be calculated and reported as an odds ratio (OR) with 95% confidence intervals. The model's variables include all the variables affecting the occurrence of death, which have been proven in the literature review. A significance level of 0.05 was considered in all tests. IBM SPSS version 26.0 software was used for data analysis.

Results

Demographic features of the patients. Of 248 patients, 134 (54%) were men, with an age range of 11 to 96 and a median age of 51.04±15.67 years. The mean age of the participants in the control group was 53.68±17.31 years. The details of the mean age of each center are provided in Table 1. There was not a significant difference between the age of the case and the control groups.

Patients in C1, C2, and C3 have received a transplant since 7.15±4.09, 12.56±12.54, and 6.66±6.14 years ago, respectively. Hospitalization associated with COVID-19 was for all patients, besides that there were 18 patients in control, 6 patients in C1, 3 patients in C2, and 15 patients in C3 groups admitted to an intensive care unit (ICU) because they needed intense support for failing organ systems, treatment, constant monitoring, and frequent nursing care, with a mean hospital stay of 7.44±7.95, 7.50±6.41, and 8.00±10.25 days, respectively. Table 1 shows the detailed characteristics of the study population.

The major maintenance immunosuppressive agents currently used in various combination regimens for case groups were Prednisolone (120 patients, $p = 0.001$), Tacrolimus (58 patients, $p = 0.004$), Sirolimus (3 patients, $p = 0.453$), Cyclosporine (80 patients, $p = 0.321$), Cellcept (98 patients, $p < 0.0001$), and Azathioprine (3 patients, $p = 0.007$).

Radiographic findings. Bilateral interstitial pneumonia was seen in C1 (71.90%), C2 (41.30%), and C3 (44%) ($p = 0.013$). Unilateral involvement was seen in the control group sharply high (76 patients) but in other centers was not too high (27 patients, 18.8%), and Consolidation was not a lot between the centers (32 patients, 22.5%). In contrast, Ground-glass opacity (GGO) was an enormous amount between the centers (114 patients, 79.2%) and effective in centers ($p = 0.021$). Radiologic features of patients shown in Table 2.

Post-COVID-19 clinical complications and conditions. Fever, chills, and myalgia were the most common prolonged symptoms commonly reported in patients infected with COVID-19. Among these patients, fever (132 patients, 53.7%) was the most common symptom, and 65 patients were from the control group ($p = 0.003$).

Details of clinical complication was demonstrated in Table 2.

The average oxygen saturation (SpO_2) for C1 on admission was 91.20±6.17%, and in discharge was 96.68±1.66%, for C2 on admissions was 91.97±4.10&, and in discharge was 95.15±2.79%, for C3 on admissions was 91.96±7.11%, and in discharge was 88.26±19.15%, and for the control group on admissions was 95.40±4.48%, and in discharge was 88.26±19.15%, showing that SpO_2 was higher in the control group. Further data are summarized in Table 3.

Chronic kidney disease (CKD) before transplant also was massive among patients (54.9%, $p < 0.0001$). Following that, in C3, 54,2% did Hemodialysis and 10% did Continuous renal replacement therapy (CRRT), which shows that kidneys were failed to purifying the blood from waste products such as creatinine and urea and free water ($p = 0.017$ and $p = 0.006$, respectively). It was seen that minor individuals had Polycystic ovary syndrome (PCOS) before the transplant (4 patients, 2.7%), ($p = 0.036$). Our study diagnosed AHF in C2 (1 patient) and C3 (8 patients). Different types of issues are in Table 4.

Discussion

After the transplant, people in the hospital experienced persistent COVID-19-related symptoms. This study aims to check whether transplants can lead to prolongation of COVID-19 symptoms. Generally, it is difficult to estimate the prevalence, characteristics, and duration of this new condition called a post-COVID syndrome, primarily because there is currently no accepted case definition for post-COVID syndrome and consensus on diagnostic procedures [5]. Most of the early data on post-COVID syndrome emerged from the follow-up of hospitalized individuals with COVID-19 who had a more severe disease course and, consequently, reported a higher prevalence of persistent symptoms.

We found post-COVID syndrome in patients with a mild to moderate COVID-19 course. So far, only two studies have been published on the post-COVID long-term outcomes in KTR. In the prospective co-

Table 1. Characteristics of study participants

Characteristics		Center 1	Center 2	Center 3	Control group	P value
Age, years, mean±SD		47.37±12.26	49.35±13.90	50.44±16.00	53.68±17.31	0.029
Sex, n (%)	Male	19 (54.3)	43 (68.3)	32 (64)	42 (44.2)	< 0.0001
Years since transplantation, years, mean±SD		7.15±4.09	12.56±12.54	6.66±6.14	0	0
Duration of hospitalization in ICU, days, mean±SD		7.50±6.41	0	8.00±10.25	6.33±4.73	0.955
Drug history						
Prednisolone, n (%)		30 (85.7)	58 (92.1)	32 (64)	0	0.001
Tacrolimus, n (%)		6 (17.6)	25 (39.7)	27 (54)	0	0.004
Sirolimus, n (%)		1 (2.9)	2 (3.2)	0 (0)	0	0.453
Cyclosporine, n (%)		13 (38.2)	34 (54)	23 (46)	0	0.321
Cellcept, n (%)s		29 (82.9%)	49 (77.8%)	20 (40%)	0	< 0.0001
Azathioprine, n (%)		3 (8.6)	0 (0)	0 (0)	0	0.007
Past medical history						
PCOS, n (%)		3 (8.8)	0	1 (2)	0	0.036
Chronic kidney infection, n (%)		7 (21.2)	6 (9.5)	2 (4.1)	0	0.042
ADPKD		0	1	0	0	0
Kidney cancer, n (%)		2 (6.1)	2 (3.2)	4 (8)	0	0.527
CKD, n (%)		8 (25.8)	28 (44.4)	43 (86)	0	< 0.0001
HTN, n (%)		16 (45.7)	43 (68.3)	35 (70)	19 (19)	< 0.0001
CVA, n (%)		2 (5.7)	1 (1.6)	0	21 (21)	< 0.0001
Cardiovascular surgery, n (%)		5 (14.3)	0	2 (4)	4 (4)	0.784
DM, n (%)		10 (30.3)	17 (27.0)	23 (46)	28 (28)	0.301
Malignancy, n (%)		0	0	1 (2)	3 (3)	0.154
Chronic liver disease, n (%)		0	0	3 (2)	1 (1)	0.529
Brain diseases, n (%)		1 (2.9)	1 (1.6)	5 (10)	1 (1)	0.103
Complications						
CKD, n (%)		1 (2.9)	1 (1.6)	1 (2)	0	0.152
AIDS, n (%)		0	0	0	0	0
COPD, n (%)		0	0	1 (2)	1 (1)	0.779
ARDS, n (%)		1 (2.9)	0	0	2 (2)	0.349
Pneumonia, n (%)		1 (2.9)	0	0	1 (1)	0.779

Abbreviations: ICU, Intensive care unit; PCOS, Polycystic ovary syndrome; ADPKD, Autosomal dominant polycystic kidney disease; CKD, Chronic kidney disease; HTN, Hypertension; CVA, Cerebrovascular accident; DM, Diabetes mellitus; AIDS, Acquired immunodeficiency syndrome; COPD, Chronic obstructive pulmonary disease; ARDS, Acute respiratory distress syndrome.

Table 2. Post-COVID-19 radiographic features of study participants

Types of problem	Center 1	Center 2	Center 3	Control group	P value
Bilateral lung involvement, n (%)	23 (71.9%)	26 (41.3%)	22 (44%)	0	0.013
Unilateral lung involvement, n (%)	8 (25.8%)	9 (14.3%)	10 (20%)	76 (83.5%)	0.389
Consolidation, n (%)	7 (23.3%)	9 (14.3%)	16 (32.7%)	0	0.069
GGO, n (%)	30 (96.8%)	48 (76.2%)	36 (72%)	0	0.021
Peripheral involvement, n (%)	15 (48.4%)	29 (46%)	20 (40%)	0	0.719
Peribronchovascular involvement, n (%)	6 (20%)	6 (9.5%)	8 (16%)	0	0.348
Involvement in lung base, n (%)	12 (40%)	3 (4.9%)	3 (6.1%)	0	< 0.0001
Cavitary lesions, n (%)	0	3 (4.9%)	0	0	0.134
Diffuse pulmonary nodules, n (%)	0	0	0	0	0
Tree-in-bud pattern, n (%)	0	0	13 (26%)	0	< 0.0001
Pleural effusion, n (%)	2 (6.7%)	10 (15.9%)	11 (22.4%)	0	0.181
Lymphadenopathy, n (%)	0	1 (1.6%)	8 (16%)	0	0.002
Linear opacities, n (%)	0	0	2 (4%)	0	0.152
Crazy paving, n (%)	12 (40%)	3 (4.8%)	22 (44%)	0	< 0.0001
Reversed halo sign, n (%)	0	2 (3.2%)	14 (28%)	0	< 0.0001

Abbreviations: GGO, Ground-glass opacity.

Table 3. Self-reported symptoms by study participants.

Symptoms	Center 1	Center 2	Center 3	Control group	P-value
Fever, n (%)	2 (5.7%)	44 (69.8%)	21 (42%)	65 (65%)	0.003
Chills, n (%)	1 (3.1%)	45 (71.4%)	16 (32%)	64 (64%)	0.001
Myalgia, n (%)	2 (6.1%)	21 (33.3%)	18 (36%)	44 (44%)	0.01
Headache, n (%)	1 (3%)	10 (15.9%)	4 (8%)	6 (6%)	0.239
Dry cough, n (%)	3 (9.1%)	40 (63.5%)	24 (48%)	34 (34.3%)	0.072
Sore throat, n (%)	1 (2.9%)	9 (14.3%)	2 (4%)	0	0.003
Sputum discharge, n (%)	2 (5.7%)	1 (1.6%)	4 (8%)	6 (6%)	0.337
Dyspnea, n (%)	1 (3%)	40 (63.5%)	33 (66%)	47 (47%)	0.570
Hemoptysis, n (%)	0	1 (1.6%)	0	1 (1%)	0.787
Chest pain, n (%)	0	2 (3.2%)	1 (2%)	6 (6%)	0.105
Rhinorrhea, n (%)	1 (2.9%)	1 (1.6%)	2 (4%)	0	0.149
Nasal congestion, n (%)	0	2 (3.2%)	1 (2%)	0	0.002
Nausea Vomiting, n (%)	2 (6.1%)	24 (38.1%)	14 (28%)	11 (11%)	0.002
Diarrhea, n (%)	0	17 (27%)	7 (14%)	8 (8%)	0.053
Constipation, n (%)	6 (18.2%)	1 (1.6%)	2 (4%)	0	0.011
Loss of appetite, n (%)	1 (3%)	8 (12.7%)	3 (6%)	7 (7%)	0.725
Arthralgia, n (%)	0	8 (12.7%)	0	0	0.017
Stomachache, n (%)	0	1 (1.6%)	3 (6%)	5 (5%)	0.354
Vertigo, n (%)	0	11 (17.5%)	2 (4%)	0	0.002
Attention disorder, n (%)	0	3 (4.8%)	0	1 (1%)	0.521
Memory disorder, n (%)	0	3 (4.8%)	0	0	0.133
Depression, n (%)	2 (6.1%)	4 (6.3%)	0	0	0.196
Anosmia, n (%)	0	5 (7.9%)	0	0	0.033
Ageusia, n (%)	0	1 (1.6%)	0	0	0.515
Dermatologic manifestations, n (%)	0	2 (3.2%)	0	0	0.263
Hair loss, n (%)	2 (6.1%)	13 (20.6%)	0	0	0.001
Sleep disturbances, n (%)	1 (3%)	2 (3.2%)	0	0	0.450
Weight loss, n (%)	6 (18.2%)	9 (14.3%)	0	0	0.011
Weight gain, n (%)	1 (3%)	2 (3.2%)	0	0	0.450
Cardiac manifestations, n (%)	1 (3%)	1 (1.6%)	10 (20%)	0	0.001
Decreased sense of touch, n (%)	1 (3%)	1 (1.6%)	0	0	0.499
CNS manifestations, n (%)	1 (3%)	0	11 (22%)	0	< 0.0001
Cyanosis in lips and face, n (%)	1 (3%)	0	0	0	0.178

Table 4. Post-COVID-19 conditions

Conditions, mean±SD	Center 1	Center 2	Center 3	Control group	P value
SpO_2 on admission, mean±SD	91.20±6.17	91.97±4.10	91.96±7.11	95.40±4.48	< 0.0001
SpO_2 on discharge, mean±SD	96.68±1.66	95.15±2.79	88.26±19.15	0	0.005
BUN on admission, mean±SD	34.09±24.03	76.24±48.47	44.58±30.93	20.56±12.46	< 0.0001
BUN on discharge, mean±SD	29.33±20.76	110.36±218.38	43.38±26.29	0	< 0.0001
Creatinine on admission, mean±SD	1.59±1.27	4.31±17.68	3.25±2.28	1.48±3.60	< 0.0001
Creatinine on discharge, mean±SD	1.23±0.69	1.97±1.46	2.26±1.18	0	< 0.0001
LDH on admission, mean±SD	720.30±253.00	459.02±183.70	707.17±439.63	442.39±168.24	0.003
AKF, n (%)	0	0	14 (28%)	0	0.002
Hemodialysis, n (%)	1 (2.9%)	10 (15.9%)	13 (26%)	0	0.017
CRRT, n (%)	0	0	5 (10%)	0	0.006

Abbreviations: SpO_2, Oxygen saturation; BUN, Blood urea nitrogen; LDH, Lactate dehydrogenase; AKF, Acute kidney disease; CRRT, Continuous renal replacement therapy.

hort study by Basic-Jukic et al., only 11.53% of 104 KTR who survived acute mild to moderate COVID-19 had no clinical symptoms or were free from any laboratory abnormality during the median follow-up of 64 days (range: 50–76 days) after recovery [6].

In our study, prolonged symptom duration and clinical complications were present in 0 to 10% of patients in C1, but in C2 and C3 range in too varied but in control group in average was higher than centers like fever (65%). In contrast, a small number of individuals had one or more laboratory abnormalities, and the most significant abnormalities were HTN which in C3 was 70%. Many patients require ICU admission for severe complications. In a study, Chauhan et al. reported their investigation regarding the long-term consequences of COVID-19 in KTR from India. Even in individuals with a mild course of COVID-19, persistent symptoms and deterioration in the quality of life were observed up to 6 months after follow-up. Fatigue, alopecia, sleep disturbances, and loss of appetite were the most frequently reported symptoms, and anxiety/depression was the worst affected component of quality of life [8].

Previous studies used various diagnostic methods (questionnaires, laboratory or imaging tests) and focused on different groups of patients. As a result, data on the majority of the post-COVID syndrome in the total population vary greatly, ranging from 75–93% in hospitalized patients [7, 12, 21], to 10–20% in patients with a mild course of the disease [2, 20]. On the contrary, at least one persistent symptom at six months post-disease was observed in only 8% of KTR in the recent study from India. Notably, the studied cohort was significantly younger than our patients, and the most remarkable thing is the age that is so widely varied from 22 to 96.

Moreover, the percentage of patients with a severe course of COVID-19 was not significant and amounted only to 12% [8]. Most of the conditions that happened to patients were fatigue and weakness. also we found that fatigue was the most common persistent symptom in KTR, consistent with data from the long-term follow-up study of Huang et al. in the general population and KTR from India [8, 12].

However, the course of COVID-19 in our research was mainly moderate, without significant respiratory involvement. As in other studies, hair loss, sleep difficulties, myalgia, and memory disturbances were some of the most frequently reported persistent symptoms [1, 8]. Hair loss was the other most frequently reported complaint, which in transplant may result from the cumulative effects of COVID-19, and the side effects of immunosuppressants, particularly tacrolimus or other drugs [23, 25].

Basic-Jukic et al.'s study demonstrated that complications were more frequent in KTR with diminished glomerular filtration and those with diabetes mellitus [6]. Older age, gender, and initial dyspnea were found to be significantly associated with an increased risk of the post-COVID syndrome in the general population [3, 9, 16]. In a controlled cohort investigation, including 47.780 citizens of England, Ayoubkhani et al. displayed that people released from hospital after COVID-19 had increased rates of multiorgan dysfunction (particularly respiratory and cardiometabolic) compared with a matched control group from the general population without COVID-19 in history [4].

Conclusion

In conclusion, recovery from acute COVID-19 is associated with different clinical and laboratory complications in the renal transplant population, regardless of the age or severity of initial symptoms. The constant symptoms, weakness, hair loss, dyspnea, mental disorders, myalgia, and headaches were more frequent in older patients and those with more significant comorbidity. Finally, we can say transplants can reduce immunity in patients with COVID-19. Our results highlight the need for a long-term follow-up of convalescences in this population for diagnostic and rehabilitation programs. All patients who recovered from COVID-19 should undergo long-term monitoring to evaluate and treat complications. Further studies with long-term follow-up are needed.

Acknowledgments

Thanks to the Clinical Research Development Unit of Ayatollah Rouhani Hospital in Babol and Hemmat gholinia for helping us in this research.

Funding

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors received no specific funding for this work.

Availability of data and materials

All relevant data are within the paper however, any question or other file data is required you can contact us using the email address, upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval. It was approved by the ethics committee of Ethics Committee of Babol University of Medical Sciences IR.MUBABOL.HRI.REC.1401.086.
Consent for publication. Not applicable.
Competing Interests. The authors have declared that no competing interests exist.
All relevant data are within the paper and its Supporting Information file. However, any question or other file data is required you can contact us using the email address "manabaziboron@gmail.com", upon reasonable request.

References

1. Aiyegbusi O.L., Hughes S.E., Turner G., Rivera S.C., McMullan C., Chandan J.S., Haroon S., Price G., Davies E.H., Nirantharakumar K., Sapey E., Calvert M.J.; TLC Study Group. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J. R. Soc. Med., 2021, vol. 114, no. 9, pp. 428–442. doi: 10.1177/01410768211032850*
2. Amin-Chowdhury Z., Harris R.J., Aiano F., Zavala M., Bertran M., Borrow R., Linley E., Ahmad S., Parker B., Horsley A., Hallis B., Flood J., Brown K.E., Amirthalingam G., Ramsay M.E., Andrews N., Ladhani S.N. Characterising post-COVID syndrome more than 6 months after acute infection in adults; prospective longitudinal cohort study, England. *medRxiv, 2021: 21253633. doi: 10.1101/2021.03.18.21253633*
3. Anand S., Montez-Rath M., Han J., Bozeman J., Kerschmann R., Beyer P., Parsonnet J., Chertow G.M. Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in a large nationwide sample of patients on dialysis in the USA: a cross-sectional study. *Lancet, 2020, vol. 396, no. 10259, pp. 1335–1344. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32009-2*
4. Ayoubkhani D., Khunti K., Nafilyan V., Maddox T., Humberstone B., Diamond I., Banerjee A. Post-covid syndrome in individuals admitted to hospital with COVID-19: retrospective cohort study. *BMJ, 2021 vol. 372: n693. doi: 10.1136/bmj.n693*
5. Baig A.M. Chronic COVID syndrome: need for an appropriate medical terminology for long-COVID and COVID long-haulers. *J. Med. Virol., 2021, vol. 93, no. 5, pp. 2555–2556. doi: 10.1002/jmv.26624*
6. Basic-Jukic N., Juric I., Furic-Cunko V., Katalinic L., Radic J., Bosnjak Z., Jelakovic B., Kastelan Z. Follow-up of renal transplant recipients after acute COVID-19 — a prospective cohort single-center study. *Immun. Inflamm. Dis., 2021, vol. 9, no. 4, pp. 1563–1572. doi: 10.1002/iid3.509*
7. Carfì A., Bernabei R., Landi F.; Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. *JAMA, 2020, vol. 324, no. 6, pp. 603–605. doi: 10.1001/jama.2020.12603*
8. Chauhan S., Meshram H.S., Kute V., Patel H., Desai S., Dave R. Long-term follow-up of SARS-CoV-2 recovered renal transplant recipients: A single-center experience from India. *Transpl. Infect. Dis., 2021, vol. 23, no. 6: e13735. doi: 10.1111/tid.13735*
9. Fernández-de-Las-Peñas C., Palacios-Ceña D., Gómez-Mayordomo V., Florencio L.L., Cuadrado M.L., Plaza-Manzano G., Navarro-Santana M. Prevalence of post-COVID-19 symptoms in hospitalized and non-hospitalized COVID-19 survivors: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Intern. Med., 2021, vol. 92, pp. 55–70. doi: 10.1016/j.ejim.2021.06.009*
10. Guillen E., Pineiro G.J., Revuelta I., Rodriguez D., Bodro M., Moreno A., Campistol J.M., Diekmann F., Ventura-Aguiar P. Case report of COVID-19 in a kidney transplant recipient: does immunosuppression alter the clinical presentation? *Am. J. Transplant., 2020, vol. 20, no. 7, pp. 1875–1878. doi: 10.1111/ajt.15874*
11. Hasan I., Rashid T., Suliman S., Amer H., Chirila R.M., Mai M.L., Jarmi T., Khouzam S., Franco P.M., Heilig C.W., Wadei H.M. Predictors of disease severity and outcome of hospitalized renal transplant recipients with COVID-19 infection: a systematic review of a globally representative sample. *Rom. J. Intern. Med., 2021, vol. 59, no. 1, pp. 10–42. doi: 10.2478/rjim-2020-0034*
12. Huang C., Huang L., Wang Y., Li X., Ren L., Gu X., Kang L., Guo L., Liu M., Zhou X., Luo J., Huang Z., Tu S., Zhao Y., Chen L., Xu D., Li Y., Li C., Peng L., Li Y., Xie W., Cui D., Shang L., Fan G., Xu J., Wang G., Wang Y., Zhong J., Wang C., Wang J., Zhang D., Cao B. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet, 2021, vol. 397, no. 10270, pp. 220–232. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8*
13. Johnson K.M., Belfer J.J., Peterson G.R., Boelkins M.R., Dumkow L.E. Managing COVID-19 in renal transplant recipients: a review of recent literature and case supporting corticosteroid-sparing immunosuppression. *Pharmacotherapy, 2020, vol. 40, no. 6, pp. 517–524. doi: 10.1002/phar.2410*
14. Kant S., Menez S.P., Hanouneh M., Fine D.M., Crews D.C., Brennan D.C., Sperati C.J., Jaar B.G. The COVID-19 nephrology compendium: AKI, CKD, ESKD and transplantation. *BMC Nephrol., 2020, vol. 21, no. 1: 449. doi: 10.1186/s12882-020-02112-0*
15. Khairallah P., Aggarwal N., Awan A.A., Vangala C., Airy M., Pan J.S., Murthy B.V.R., Winkelmayer W.C., Ramanathan V. The impact of COVID-19 on kidney transplantation and the kidney transplant recipient — one year into the pandemic. *Transpl. Int., 2021, vol. 34, no. 4, pp. 612–621. doi: 10.1111/tri.13840*
16. Lopez-Leon S., Wegman-Ostrosky T., Perelman C., Sepulveda R., Rebolledo P.A., Cuapio A., Villapol S. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep., 2021, vol. 11, no. 1: 16144. doi: 10.1038/s41598-021-95565-8*
17. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens J.S., Cook J.R., Nordvig A.S., Shalev D., Sehrawat T.S., Ahluwalia N., Bikdeli B., Dietz D., Der-Nigoghossian C., Liyanage-Don N., Rosner G.F., Bernstein E.J., Mohan S., Beckley A.A., Seres D.S., Choueiri T.K., Uriel N., Ausiello J.C., Accili D., Freedberg D.E., Baldwin M., Schwartz A., Brodie D., Garcia C.K., Elkind M.S.V., Connors J.M., Bilezikian J.P., Landry D.W., Wan E.Y. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med., 2021, vol. 27, no. 4, pp. 601–615. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z*
18. Negi S., Koreeda D., Kobayashi S., Yano T., Tatsuta K., Mima T., Shigematsu T., Ohya M. Acute kidney injury: epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. *Semin. Dial., 2018, vol. 31, no. 5, pp. 519–527. doi: 10.1111/sdi.12705*
19. Pierce J.D., Shen Q., Cintron S.A., Hiebert J.B. Post-COVID-19 syndrome. *Nurs. Res., 2022, vol. 71, no. 2, pp. 164–174. doi: 10.1097/NNR.0000000000000565*
20. Sudre C.H., Murray B., Varsavsky T., Graham M.S., Penfold R.S., Bowyer R.C., Pujol J.C., Klaser K., Antonelli M., Canas L.S., Molteni E., Modat M., Jorge Cardoso M., May A., Ganesh S., Davies R., Nguyen L.H., Drew D.A., Astley C.M., Joshi A.D., Merino J., Tsereteli N., Fall T., Gomez M.F., Duncan E.L., Menni C., Williams F.M.K., Franks P.W., Chan A.T., Wolf J., Ourselin S., Spector T., Steves C.J. Attributes and predictors of long COVID. *Nat. Med., 2021, vol. 27, no. 4, pp. 626–631. doi: 10.1038/s41591-021-01292-y*
21. Sykes D.L., Holdsworth L., Jawad N., Gunasekera P., Morice A.H., Crooks M.G. Post-COVID-19 symptom burden: what is long-COVID and how should we manage it? *Lung, 2021, vol. 199, no. 2, pp. 113–119. doi: 10.1007/s00408-021-00423-z*
22. Tadbiri H., Moradi-Lakeh M., Naghavi M. All-cause excess mortality and COVID-19-related deaths in Iran. *Med. J. Islam. Repub. Iran, 2020, vol. 34: 80. doi: 10.34171/mjiri.34.80*

23. Tielemans M.M., van Boekel G.A.J., van Gelder T., Tjwa E.T., Hilbrands L.B. Immunosuppressive drugs and the gastrointestinal tract in renal transplant patients. *Transplant. Rev. (Orlando), 2019, vol. 33, no. 2, pp. 55–63. doi: 10.1016/j.trre.2018.11.001*
24. Townsend L., Dowds J., O'Brien K., Martin-Loeches I., Nadarajan P., Bannan C. Reply: the relation between persistent poor health after COVID-19 and respiratory complications or initial disease severity. *Ann. Am. Thorac. Soc., 2021, vol. 18, no. 8, pp. 1431–1432. doi: 10.1513/AnnalsATS.202101-073LE*
25. Tricot L., Lebbé C., Pillebout E., Martinez F., Legendre C., Thervet E. Tacrolimus-induced alopecia in female kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation, 2005, vol. 80, no. 11, pp. 1546–1549. doi: 10.1097/01.tp.0000181195.67084.94*

Авторы:
Шафихани М., доцент кафедры клинической фармации, Центр трансплантологии Шираз, больница Абу-Али Сина, Ширазский университет медицинских наук, г. Шираз, Иран;
Аболгасеми С., ассистент кафедры инфекционных болезней, Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Университет медицинских наук им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран;
Асгарпур М., ассистент кафедры нефрологии, Отделение нефрологии, Больница медицинских наук Рухани, г. Баболь, Иран;
Заре З., Студенческий исследовательский комитет, Центр трансплантологии Шираз, больница Абу-Али Сина, Ширазский университет медицинских наук, г. Шираз, Иран;
Негабан Х., Совет по проблеме инфекционных заболеваний у пациентов с ослабленным иммунитетом и пациентов после трансплантации, Кафедра инфекционных болезней и тропической медицины, Медицинский факультет, Университет медицинских наук им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран;
Акбари Р., доцент кафедры нефрологии, Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Научно-исследовательский институт здравоохранения, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран;
Никупур Х., Ассистент кафедры гепатопанкреатобилиарной хирургии и трансплантации органов брюшной полости, Центр трансплантологии Шираз, больница Абу-Али Сина, Ширазский университет медицинских наук, г. Шираз, Иран;
Розбех Дж., профессор нефрологии, Центр трансплантологии Шираз, больница Абу-Али Сина, Ширазский университет медицинских наук, г. Шираз, Иран;
Олиайе Ф., доцент кафедры нефрологии, Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Научно-исследовательский институт здравоохранения, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран;
Яхьяпур Ю., профессор медицинской вирусологии, Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Научно-исследовательский институт здравоохранения, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран;
Джерайли З., аспирант кафедры биостатистики, Студенческий исследовательский комитет, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран;
Барари М., Студенческий исследовательский комитет, Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Научно-исследовательский институт здравоохранения, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран;
Эбрахимпур С., доцент клинических наук (исследовательская деятельность), Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Научно-исследовательский институт здравоохранения, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран;
Базиборун М., Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Университет медицинских наук им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран; Исследовательский центр инфекционных заболеваний и тропической медицины, Научно-исследовательский институт здравоохранения, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран; Отдел развития клинических исследований больницы Рухани, Бабольский университет медицинских наук, г. Баболь, Иран.

Authors:
Shafiekhani M., Assistant Professor of Clinical Pharmacy, Shiraz Transplant Center, Abu-Ali Sina Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran;
Abolghasemi S., Assistant Professor of Infectious Disease, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran;
Asgharpour M., Assistant Professor of Nephrology,Department of Nephrology, Rouhani Hospital of Medical Sciences, Babol, Iran;
Zare Z., Student Research Committee, Shiraz Transplant Center, Abu-Ali Sina Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran;
Negahban H., Fellowship of Infection in Immunocompromised and Transplant Patients, Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
Akbari R., Associate Professor of Nephrology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran;
Nikoupour H., Assistant Professor of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery and Abdominal Organ Transplantation, Shiraz Transplant Center, Abu-Ali Sina Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran;
Roozbeh J., Professor of Nephrology, Shiraz Transplant Center, Abu-Ali Sina Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran;
Oliaie F., Associate Professor of Nephrology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran;
Yahyapour Y., Professor of Medical Virology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran;
Geraili Z., PhD student in Biostatistics, Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran;
Barari M., Student Research Committee, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran;
Ebrahimpour S., Assistant Professor of Clinical Sciences (By Research), Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran;
Baziboroun M., Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran; Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran; Clinical Research Development Unit of Rouhani Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Поступила в редакцию 26.02.2023
Принята к печати 30.04.2023

Received 26.02.2023
Accepted 30.04.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 567–572
Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 567–572

ГРИБКОВАЯ АЛЛЕРГИЯ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ РОЗАЦЕА

А.А. Барило, С.В. Смирнова

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Резюме. Патогенез розацеа до конца не изучен. При данном заболевании отмечено высвобождение воспалительных молекул и чрезмерный рост колонизирующих кожу микроорганизмов, включающих грибковую микрофлору. Изучение частоты встречаемости и характера спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам у больных розацеа представляет особый интерес и определяет актуальность проведенного исследования. Цель работы — изучить частоту встречаемости и характер спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам больных розацеа. *Материалы и методы.* В исследование включены больные розацеа в возрасте от 18 до 60 лет (1 группа, n = 31). Всем больным проведено специфическое аллергологическое обследование: сбор аллергологического анамнеза, кожное prick-тестирование с использованием следующих аллергенов: пищевые дрожжи, *Candida albicans*, *Alternaria alternate*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum* (Allergopharma, Германия). Определение концентрации общего иммуноглобулина Е (IgE) и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови проведено методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа на полуавтоматическом анализаторе Thermo Scientific Multiskan FC. Для статистического анализа применяли пакет прикладных программ Statistica 8.0. *Результаты.* Анализ особенностей спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам в группе больных розацеа показал, что наиболее значимыми аллергенами являются *Cladosporium herbarum* (74,2% больных) и *Candida albicans* (58,1%). Сенсибилизация к пищевым дрожжам и *Penicillium notatum* была определена практически у половины больных. Концентрация общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови в группе больных розацеа составила 79,4 МЕ/мл [23,4; 105,1], в контрольной группе — 45,1 МЕ/мл [23,4; 144,0]. Концентрация эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови в группе больных розацеа была статистически значимо выше в сравнении с контрольной группой: 50,3 нг/мл [43,0; 62,0] и 7,9 нг/мл [4,6; 27,1] соответственно. После проведения кожного prick-тестирования с грибковыми аллергенами больным розацеа назначалась индивидуальная элиминационная диета с исключением причинно-значимых аллергенов сроком на 1 месяц. В 61,2% (n = 19) случаев у больных розацеа отмечен положительный эффект элиминации: значительное уменьшение выраженности эритемы, папул и пустул в области лица. *Выводы.* Таким образом, в проведенном исследовании выявлена высокая частота встречаемости грибковой аллергии и установлены особенности спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам больных розацеа. Наиболее значимыми грибковыми аллергенами при розацеа являются грибки рода *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, а также пищевые дрожжи.

Ключевые слова: *розацеа, эритема, аллергия, аллергены, сенсибилизация, грибки.*

Адрес для переписки:
Барило Анна Александровна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 391 226-060-83.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Contacts:
Anna A. Barilo
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3g, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 391 228-060-83.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Для цитирования:
Барило А.А., Смирнова С.В. Грибковая аллергия как фактор риска развития розацеа // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 567–572. doi: 10.15789/2220-7619-FAA-8038

Citation:
Barilo A.A., Smirnova S.V. Fungal allergy as a risk factor for developing rosacea // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 567–572. doi: 10.15789/2220-7619-FAA-8038

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-FAA-8038

FUNGAL ALLERGY AS A RISK FACTOR FOR DEVELOPING ROSACEA

Barilo A.A., Smirnova S.V.

Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of rosacea is not fully understood. In this disease, the release of inflammatory molecules and overgrowth of skin-colonizing microorganisms, including fungal microbiota, are noted. The study of the frequency of occurrence and the nature of the spectrum of sensitization to fungal allergens in patients with rosacea is of particular interest and accounts for relevance of the study. Purpose of the study: to analyze the frequency of occurrence and the nature of the spectrum of sensitization to fungal allergens in patients with rosacea. *Materials and methods.* The study included patients with rosacea aged 18 to 60 years (group 1, n = 31). All patients underwent a specific allergic examination: collected allergic history, skin prick testing using the following allergens: nutritional yeast, *Candida albicans*, *Alternaria alternate*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum* (Allergopharma, Germany). Concentration of total immunoglobulin E (IgE) and eosinophilic cationic protein in blood serum was measured in indirect immunofluorescence analysis with Thermo Scientific Multiskan FC semi-automatic analyzer. Statistica 8.0 software package was used for statistical analysis. *Results.* Analysis of the features of the spectrum of sensitization to fungal allergens in the group of patients with rosacea showed that the most significant allergens are *Cladosporium herbarum* (74.2% of patients) and *Candida albicans* (58.1%). Sensitization to nutritional yeast and *Penicillium notatum* was detected in almost half of the patients. The concentration of total immunoglobulin E in blood serum in the group of patients with rosacea was 79.4 IU/ml [23.4; 105.1], in the control group — 45.1 IU/ml [23.4; 144.0]. The concentration of eosinophilic cationic protein in blood serum in the group of patients with rosacea was significantly higher compared to the control group: 50.3 ng/ml [43.0; 62.0] and 7.9 ng/ml [4.6; 27.1], respectively. After skin prick testing with fungal allergens, patients with rosacea were prescribed an individual elimination diet with the exclusion of causally significant allergens for a period of 1 month. In 61.2% (n = 19) of cases in patients with rosacea, a positive elimination effect was noted: a significant decrease in the severity of erythema, papules and pustules in the face. *Conclusion.* Thus, the study revealed a high incidence of fungal allergy and established the features of the spectrum of sensitization to fungal allergens in patients with rosacea. The most significant fungal allergens in rosacea are fungi of the genus *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum* as well as nutritional yeast.

Key words: *rosacea, erythema, allergy, allergens, sensitization, fungi.*

Введение

Розацеа представляет собой хроническое заболевание кожи, характеризующееся частыми рецидивами и различными клиническими признаками, такими как эритема кожи лица, телеангиэктазии, папулы, пустулы и гиперплазия кожи (фиматозные проявления). Этиология и патогенез розацеа до сих пор остаются неизвестными [1, 22]. Предполагающими факторами развития заболевания являются аномалии врожденного иммунитета, гиперреактивность сосудов, ультрафиолетовое облучение, патология желудочно-кишечного тракта и генетическая предрасположенность [1, 6]. Многочисленные исследования подтверждают роль микроорганизмов в развитии розацеа. Известно о важной роли *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* и клеща *Demodex folliculorum*, являющегося переносчиком бактерий *Bacillus oleronius* и *Bartonella quintana* [18, 22, 23, 26]. В литературе активно обсуждается вопрос о нарушении микробиома при различных заболеваниях кожи, таких как атопический дерматит, акне, псориаз и себорейный дерматит [12, 13, 14, 19]. Однако не существует единого мнения о приоритетном микроорганизме, принимающем участие в развитии розацеа, что обуславливает актуальность дальнейшего изучения проблемы [20]. Особого внимания заслуживает изучение роли грибковой микрофлоры в развитии розацеа, поскольку в литературе последних лет появились данные о том, что у больных розацеа отмечаются изменения не только микробиома кожи, но и микробиоты кишечника в результате существования оси «кожа–кишечник» [17]. Причем нарушения микробиоты являются результатом чрезмерной колонизации грибковой микрофлорой слизистой оболочки кишечника [24]. Дисбиоз кожи и кишечника играет важную роль в патогенезе розацеа в результате нарушения врожденного и адаптивного иммунитета [20]. Кишечные бактерии и грибки могут оказывать влияние на активацию калликреин-кининовой системы сыворотки крови, приводя к развитию сосудистых нарушений при розацеа [24]. Кроме того, колонизация кожи и кишечника грибковой микрофлорой может приводить к развитию сенсибилизации в результате высокой антигенной активности микотоксинов [16]. Наличие сенсибилизации к грибковым аллергенам может быть одним из механизмов повреждения кожи, проявляющихся различными заболеваниями: атопическим дерматитом, псориазом, себорейным дерматитом и т.п. [2, 3, 4, 5, 12, 21, 25] Аллергические заболевания кожи характеризуются дисфункцией эпителиального барьера, ко-

торый регулирует проникновение неинфекционных и инфекционных аллергенов, приводящих к высвобождению цитокинов Th2-типа, запускающих аллергическое воспаление [15]. Именно кожа является одним из первых барьеров, взаимодействующих с различными аллергенами наряду с респираторным и желудочно-кишечным трактами [12]. Аномалии дифференцировки и пролиферации кератиноцитов при заболеваниях кожи приводят к гиперпролиферации базального слоя эпидермиса, ингибированию маркеров терминальной дифференцировки, нарушениям липидного барьера и антимикробной функции кожи. Причем эпителиальная дисрегуляция отмечена не только при заболеваниях кожи, но и при повреждении других шоковых органов аллергии, в частности респираторного и желудочно-кишечного трактов [15]. IL-4 и IL-13, образующиеся при аллергических заболеваниях в большом количестве, способствуют колонизации патогенных микроорганизмов на поверхности кожи за счет ингибирования функции эпидермального барьера и снижения выработки противомикробных пептидов. Так, колонизация *S. aureus*, имеющего перекрестную реактивность с *Candida albicans* и продуцирующим суперантиген, коррелирует с повышением IL-4 в сыворотке крови. В свою очередь суперантигены *S. aureus* являются сильными активаторами продукции IL-13 и IL-22 [19].

Патогенез розацеа до конца не изучен. При данном заболевании отмечено высвобождение воспалительных молекул и чрезмерный рост колонизирующих кожу микроорганизмов, включающих грибковую микрофлору [13]. Следовательно, изучение частоты встречаемости и характера спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам у больных розацеа представляет особый интерес и определяет актуальность проведенного исследования.

Цель работы: изучить частоту встречаемости и характер спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам больных розацеа.

Материалы и методы

В исследование включены больные розацеа в возрасте от 18 до 60 лет (1 группа, n = 31). Средний возраст больных составил 36,0±2,6 лет. В исследуемой группе чаще встречались женщины — 77,4% (n = 24) случаев. В контрольную группу включены практически здоровые, сопоставимые с больными по полу и возрасту, без признаков аллергии (2 группа, n = 20).

Критериями постановки диагноза розацеа являлись жалобы на стойкую или транзиторную эритему кожи с локализацией в центральной части лица. Эритема лица сопровождалась телеангиэктазиями, папулами и пустулами.

Всем больным проведено специфическое аллергологическое обследование: сбор аллергологического анамнеза, кожное prick-тестирование с оценкой величины гиперемии (от + до ++++). Были использованы следующие грибковые аллергены: пищевые дрожжи, *Candida albicans, Alternaria alternate, Aspergillus fumigatus, Cladosporium herbarum, Penicillium notatum* (Allergopharma, Германия).

Всем больным проведено определение концентрации общего иммуноглобулина Е (IgE) и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа на полуавтоматическом анализаторе Thermo Scientific Multiskan FC.

Для статистического анализа применяли пакет прикладных программ Statistica 8.0. Статистическую обработку результатов исследования проводили с расчетом обобщающих коэффициентов: средняя величина (M) и ошибка средней (m). При анализе качественных признаков проводилась оценка относительной частоты признака (распространенность) P. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным согласием пациента. Протокол обследования был одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (этическая экспертиза № 12 от 10.12.2007 г.).

Результаты

В группе больных отмечались следующие клинические формы розацеа: эритематозно-телеангиэктатическая — у 16,1% (n = 5), папулопустулезная — у 80,6% (n = 25), фиматозная — у 3,2% (n = 1) больных. Высыпания на коже больных сопровождались интенсивным кожным зудом в 58,1% (n = 18) случаев. Средний возраст дебюта заболевания составил 34,0±2,8 года. Продолжительность заболевания в группе больных розацеа в среднем была 2,0±0,5 года.

В ходе сбора аллергологического анамнеза установлено, что у 41,2% (n = 21) больных розацеа отмечались эпизоды крапивницы и токсикодермии на пищевые продукты и медикаменты, на укусы насекомых. Отягощенный наследственный аллергологический анамнез (наличие аллергических реакций и/или заболеваний у близких родственников) выявлен у 27,5% (n = 14), наличие сезонных проявлений аллергии — у 7,8% (n = 4) больных розацеа. Отягощенный наследственный анамнез по розацеа отмечен у 39,2% (n = 20) больных.

Концентрация общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови в группе больных розацеа составила 79,4 МЕ/мл [23,4; 105,1], в кон-

трольной группе — 45,1 МЕ/мл [23,4; 144,0]. Концентрация эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови в группе больных розацеа была статистически значимо выше в сравнении с контрольной группой: 50,3 нг/мл [43,0; 62,0] и 7,9 нг/мл [4,6; 27,1] соответственно, p = 0,001.

В группе больных розацеа отмечено статистически значимое повышение частоты встречаемости сенсибилизации ко всем изучаемым аллергенам в сравнении с контрольной группой (табл.).

При этом определены особенности характера спектра сенсибилизации. Так, анализ особенностей спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам в группе больных розацеа показал, что наиболее значимым аллергеном является *Cladosporium herbarum*, сенсибилизация к которому отмечена у 74,2% больных. Также определена высокая частота встречаемости сенсибилизации к *Candida albicans* — 58,1% случаев. Сенсибилизация к пищевым дрожжам и *Penicillium notatum* была определена практически у половины больных. Наименьшая частота встречаемости сенсибилизации среди грибковых аллергенов была к *Alternaria alternate* и *Aspergillus fumigatus*.

После проведения кожного prick-тестирования с грибковыми аллергенами больным розацеа назначалась индивидуальная элиминационная диета с исключением причинно-значимых аллергенов сроком на 1 месяц. При обнаружении у больного сенсибилизации к грибковым аллергенам из питания было рекомендовано исключить продукты, имеющие в составе пищевые дрожжи (хлеб, сдоба), грибы, а также продукты на основе дрожжевого брожения: ряженка, кефир, сыр, сметана, творог, простокваша, квас, вино, пиво, квашеная капуста. Местная терапия не назначалась.

Таблица. Особенности спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам больных розацеа, % (n)

Table. Features of the spectrum of sensitization to fungal allergens in patients with rosacea, % (n)

Наименование аллергенов Allergens	**1 группа** 1 group	**p**
Candida albicans	58,1% (n = 18)	p < 0,001
Cladosporium herbarum	74,2% (n = 23)	p < 0,001
Penicillium notatum	48,4% (n = 15)	p = 0,0002
Alternaria alternate	29,0% (n = 9)	p = 0,007
Aspergillus fumigatus	38,7% (n = 12)	p = 0,001
Пищевые дрожжи Nutritional yeast	45,2% (n = 14)	p = 0,0004

Примечание. % (n) — относительное и абсолютное количество сенсибилизированных больных.

Note. % (n) — relative and absolute number of sensitized patients.

Эффективность проводимой элиминационной диетотерапии оценивалась спустя 4 недели. В 61,2% (n = 19) случаев у больных розацеа отмечено значительное улучшение, клинически проявляющееся уменьшением выраженности эритемы, папул и пустул в области лица.

Обсуждение

Таким образом, в проведенном исследовании выявлена высокая частота встречаемости грибковой аллергии и установлены особенности спектра сенсибилизации к грибковым аллергенам больных розацеа. Наиболее значимыми грибковыми аллергенами при розацеа являлись грибки рода *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*.

Человек ежедневно подвергается воздействию множества видов грибков. Многие грибки являются сапрофитами и живут в гармонии с человеком, не вызывая заболевания [11]. Патогенные воздействия грибков на человека условно можно разделить на инфекции (микозы), аллергические реакции или токсические эффекты [10]. В настоящем исследовании рассмотрена роль грибковой аллергии в развитии розацеа.

Известно, что грибковые споры вызывают различные иммунопатологические (IgE и неIgE опосредованные) аллергические реакции, приводящие к поражению различных органов и систем, в первую очередь барьерных органов (кожи, респираторного и желудочно-кишечного трактов) [10]. Причем точный механизм взаимодействия между спорами плесневых грибков и иммунной системой организма до сих пор не установлен. Формирование сенсибилизации к грибкам происходит в результате нескольких механизмов, включающих попадание спор грибков через кожу, респираторный и желудочно-кишечный тракты. Пусковым механизмом является вдыхание грибковых аэроаллергенов, употребление пищи, контаминированной спорами грибков или продуктов дрожжевого происхождения, а также при колонизации грибковой микрофлорой кожи и слизистых желудочно-кишечного тракта [14]. Наиболее распространенными видами грибков, вызывающих различные аллергические реакции являются *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum* [10], высокая частота сенсибилизации к которым отмечена у больных розацеа в настоящем исследовании. Грибки рода *Cladosporium* spp. и *Penicillium* spp. относятся к типу *Ascomycota*, для которого в настоящее время описано 88 аллергенов. Аллергены грибков включают энолазу, белки теплового шока, циклофилины, протеазы, редоксины и дисульфидизомеразы [14]. Известно, что иммунная

система кожи и слизистых оболочек респираторного и желудочно-кишечного трактов играет ключевую роль в защите организма от таких патогенов, как плесень и микотоксины [10]. Неповрежденные барьерные функции барьерных органов необходимы для эффективной и успешной элиминации патогенов и их токсических метаболитов. При розацеа эти механизмы могут нарушаться в ответ на колонизацию кожи и слизистой респираторного и желудочно-кишечного барьеров антигенами клеточной стенки грибов или иммуномодулирующее и иммунотоксическое действие микотоксинов и, следовательно, имеют важное значение для развития или обострения патологии [14, 22, 26].

Высокая частота встречаемости сенсибилизации *Candida albicans* может быть связана с наличием перекрестной реактивности данного вида грибков с *S. aureus*, колонизация которого отмечена в очагах поражения кожи у данной категории больных [23]. В литературе особое внимание отводится роли грибков рода *Penicillium* и *Candida* в развитии аллергических и аутоиммунных заболеваний кожи [21, 23].

В настоящем исследовании определена высокая частота встречаемости сенсибилизации к пищевым дрожжам. Несмотря на то, что с древних времен люди использовали грибы в качестве источников пищи, употребление в пищу продуктов дрожжевого происхождения у сенсибилизированных лиц может вызывать аллергические воспалительные реакции [11]. Известно, что аллергия на пищевые дрожжи, ярким представителям которых является *Saccharomyces cerevisiae*, формируется у больных в результате перекрестной реактивности с антигенами грибов, к которым пациент был сенсибилизирован *(C. herbarum, A. alternata, A. fumigatus, P. notatum)* [14]. Высокая частота встречаемости сенсибилизации к пищевым дрожжам у больных розацеа ориентирует клиницистов в отношении элиминационной диеты с исключением пищевых дрожжей, грибов и продуктов на основе дрожжевого брожения: кисломолочные продукты, квашеная капуста, квас, вино, пиво.

Таким образом, установленная в настоящем исследовании высокая частота встречаемости сенсибилизации к грибковым аллергенам больных розацеа в сочетании с положительным эффектом элиминационной диеты должны привлечь внимание аллергологов и дерматологов на значимость своевременной диагностики грибковой аллергии, проведения этиотропной и патогенетически обоснованной терапии с целью предупреждения обострений и прогрессирования патологии.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Адаскевич В.П. Патогенетические факторы, клинические формы и методы терапии розацеа // Вестник ВГМУ. 2004. Т. 3, № 1. С. 5–9. [Adaskevich V.P. Pathogenetic factors, clinical forms and methods of therapy for rosacea. *Vestnik VGMU = Proceedings of Voronezh State University, 2004, vol. 3, no. 1, pp. 5–9. (In Russ.)*]
2. Барило А.А., Смирнова С.В. Аллергия и себорейный дерматит — причинно-следственная взаимосвязь // Бюллетень сибирской медицины. 2022. Т. 21, № 2. С. 13–18. [Barilo A.A., Smirnova S.V. Causal relationship between allergy and seborrheic dermatitis. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine, 2022, vol. 21, no. 2, pp. 13–18. (In Russ.)*] *doi: 10.20538/1682-0363-2022-2-13-18*
3. Барило А.А., Смирнова С.В. Грибковая аллергия у больных атопическим дерматитом и псориазом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 149–157. [Barilo A.A., Smirnova S.V. Fungal allergies in patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 149–157. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-FAI-1707*
4. Барило А.А., Смирнова С.В. Пищевая аллергия как фактор риска развития акне // Вопросы питания. 2022. Т. 91, № 6. С. 74–81. Barilo A.A., Smirnova S.V. Food allergy as a risk factor for acne. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition, 2022, vol. 91, no. 6, pp. 74–81. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0042-8833-2022-91-6-00-00*
5. Барило А.А., Смирнова С.В. Роль алиментарных факторов и пищевой аллергии в развитии псориаза // Вопросы питания. 2020. Т. 89, № 1. С. 60–68. [Barilo A.A., Smirnova S.V. The role of nutritional factors and food allergy in the development of psoriasis. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition, 2020, vol. 89, no. 1, pp. 60–68. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/0042-8833-2020-10002*
6. Слесаренко Н.А., Леонова М.А., Захарова Н.Б., Слесаренко Н.С., Резникова М.А. Роль сосудистых нарушений в возникновении и поддержании воспаления в патогенезе розацеа // Саратовский научно-медицинский журнал. 2012. Т. 8, № 2. С. 650–654. [Slesarenko N.A., Leonova M.A., Zakharova N.B., Slesarenko N.S., Reznikova M.A. The role of vascular disorders in the genesis and maintenance of inflammation in the pathogenesis of rosacea. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research, 2012, vol. 8, no. 2, pp. 650–654. (In Russ.)*]
7. Царев С.В. Аллергия к грибам: особенности клинических проявлений и диагностики // Астма и аллергия. 2015. № 3. С. 3–7. [Tsarev S.V. Allergy to fungi: features of clinical manifestations and diagnostics. *Astma i allergiya = Asthma and Allergy, 2015, no. 3, pp. 3–7. (In Russ.)*]
8. Dupont J., Dequin S., Giraud T., Le Tacon F., Marsit S., Ropars J., Richard F., Selosse M.A. Fungi as a source of food. *Microbiol. Spectr., 2017, vol. 5, no. 3. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016*

9. Egawa G., Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergol Int., 2018, vol. 67, no. 1, pp. 3–11. doi: 10.1016/j.alit.2017.10.002*
10. Ellis S.R., Nguyen M., Vaughn A.R., Notay M., Burney W.A., Sandhu S., Sivamani R.K. The skin and gut microbiome and its role in common dermatologic conditions. *Microorganisms, 2019, vol. 7, no. 11: 550. doi: 10.3390/microorganisms7110550*
11. German-Sanchez A., Alonso-Llamazares A., Garcia-Gonzalez F., Matala-Ahmed B., Bartolome-Zavala B., Antepara-Ercoreca I. Allergy to beer and wine caused by Saccharomyces cerevisiae in a patient sensitized to fungi. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 2022, vol. 32, no. 4, pp. 311–313. doi: 10.18176/jiaci*
12. Goleva E., Berdyshev E., Leung D.Y. Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *J. Clin. Invest., 2019, vol. 129, no. 4, pp. 1463–1474. doi: 10.1172/JCI124608*
13. Kraft S., Buchenauer L., Polte T. Mold, mycotoxins and a dysregulated immune system: a combination of concern? *Int. J. Mol. Sci., 2021, vol. 22, no. 22: 12269. doi: 10.3390/ijms222212269*
14. Mann E.A., Bae E., Kostyuchek D., Chung H.J., McGee J.S. The gut microbiome: human health and inflammatory skin diseases. *Ann. Dermatol., 2020, vol. 32, no. 4, pp. 265–272. doi: 10.5021/ad.2020.32.4.265*
15. Murillo N., Mediannikov O., Aubert J., Raoult D. Bartonella quintana detection in Demodex from erythematotelangiectatic rosacea patients. *Int. J. Infect. Dis., 2014, vol. 29, pp. 176–177. doi: 10.1016/j.ijid.2014.07.021*
16. Paller A.S., Kong H.H., Seed P., Naik S., Scharschmidt T.C., Gallo R.L., Luger T., Irvine A.D. The microbiome in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol., 2019, vol. 143, no. 1, pp. 26–35. doi: 10.1016/j.jaci.2018.11.015*
17. Picardo M., Ottaviani M. Skin microbiome and skin disease: the example of rosacea. *J. Clin. Gastroenterol., 2014, vol. 48, no. 1, pp. 85–86. doi: 10.1097/MCG.000000000000024*
18. Pietrzak A., Grywalska E., Socha M., Roliński J., Franciszkiewicz-Pietrzak K., Rudnicka L., Rudzki M., Krasowska D. Prevalence and possible role of Candida species in patients with psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Mediators Inflamm., 2018: 9602362. doi: 10.1155/2018/9602362*
19. Rainer B.M., Thompson K.G., Antonescu C., Florea L., Mongodin E.F., Bui J., Fischer A.H., Pasieka H.B., Garza L.A., Kang S., Chien A.L. Characterization and analysis of the skin microbiota in rosacea: a case-control study. *Am. J. Clin. Dermatol., 2020, vol. 21, no. 1, pp. 139–147. doi: 10.1007/s40257-019-00471-5*
20. Totté J.E., van der Feltz W.T., Bode L.G., van Belkum A., van Zuuren E.J., Pasmans S.G. A systematic review and meta-analysis on Staphylococcus aureus carriage in psoriasis, acne and rosacea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2016, vol. 35, no. 7, pp. 1069–1077. doi: 10.1007/s10096-016-2647-3*
21. Woo Y.R., Han Y.J., Kim H.S., Cho S.H., Lee J.D. Updates on the risk of neuropsychiatric and gastrointestinal comorbidities in rosacea and its possible relationship with the gut-brain-skin axis. *Int. J. Mol. Sci., 2020, vol. 21, no. 22: 8427. doi: 10.3390/ijms21228427*
22. Yang G., Seok J.K., Kang H.C., Cho Y.Y., Lee H.S., Lee J.Y. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *Int. J. Mol. Sci., 2020, vol. 21, no. 8, pp. 2867. doi: 10.3390/ijms21082867*
23. Yuan C., Ma Y., Wang Y., Wang X., Qian C., Hocquet D., Zheng S., Mac-Mary S., Humbert P. Rosacea is associated with conjoined interactions between physical barrier of the skin and microorganisms: a pilot study. *J. Clin. Lab. Anal., 2020, vol. 34, no. 9: e23363. doi: 10.1002/jcla.23363*

Авторы:

Барило А.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Смирнова С.В., д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Barilo A.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Smirnova S.V., DSc (Medicine), Professor, Research Direction Manager, Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.03.2023
Принята к печати 09.04.2023

Received 13.03.2023
Accepted 09.04.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 573–578

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 573–578

АДГЕЗИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ К КЛЕТКАМ ИЕРСИНИЙ, ОЦЕНЕННАЯ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ЛОВУШКИ

И.В. Конышев[1,2], Л.Г. Дудина[1,2], Н.А. Морозова[2], А.А. Бывалов[1,2]

[1] *ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия*
[2] *ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия*

Резюме. В последние годы возрастает интерес к использованию бактериофагов в комплексной терапии некоторых инфекционных заболеваний. Объективно это связано с распространением антибиотикорезистентности и малым числом побочных эффектов при местном и парентеральном назначении фагов. Бактерии рода *Yersinia* не являются исключением из этого правила, однако начальные стадии их взаимодействия с вирионами подробно не изучены. В России в диагностических целях применяются три вида литических иерсиниозных бактериофагов, различающихся по специфичности, вирулентности, морфологическим свойствам. Мы оценили силу взаимодействия в системе «фаг–бактерия» методом лазерной ловушки. *Материалы и методы.* В работе использовали живые клетки *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*, различные по структуре ЛПС, и препараты трех иерсиниозных бактериофагов — Покровской, L-413C и д'Эрреля (псевдотуберкулезного диагностического). Фаг Покровской хорошо изучен и широко применяется в диагностике, однако механизм его адсорбции на клетках *Y. pestis* практически не изучен. Высокоспецифичный фаг L-413C лизирует чумные бактерии, но не псевдотуберкулезные, в то время как фаг д'Эрреля вирулентен для бактерий обоих видов. Вирионы наносили на поверхность аминированных стеклянных подложек. Микробные клетки, захваченные лазерной ловушкой, подводили к поверхности, обработанной фагами, до их соприкосновения, после чего их отводили в обратном направлении, добиваясь разрыва связи. Амплитуду сигнала пересчитывали в силу через калибровочные коэффициенты. Первичные данные обрабатывали в программе «R»; статистический анализ проводили с использованием пакетов «Matlab 7.0» и «Statistica 12». *Результаты и обсуждение.* Анализ гистограмм распределения силы, необходимой для разрыва связи, выявил присутствие специфического компонента в паре «*Y. pseudotuberculosis*–фаг д'Эрреля» (Fср. = 7,46±3,52 пН), а также во всех парах с участием чумного микроба. В последнем случае сила связи оказалась сопоставимой с вышеуказанной и составила: для фага д'Эрреля — 8,64±3,83 пН, для фага Покровской — 11,03±4,22 пН, для фага L-413C — 10,42±4,79 пН. Средняя сила отрыва от подложки, обработанной бычьим сывороточным альбумином (БСА) сопоставима для обоих типов клеток. Проведенные эксперименты свидетельствуют о возможности использования метода оптической ловушки для оценки силовых характеристик взаимодействия в системе «бактерия–фаг».

Ключевые слова: *бактериофаг, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia pestis, сенсибилизация, лазерная ловушка.*

Адрес для переписки:
Бывалов Андрей Анатольевич
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36, каб. 513а,
Вятский государственный университет.
Тел.: 8 (8332) 64-50-69. E-mail: byvalov@nextmail.ru

Contacts:
Andrey A. Byvalov
610000, Russian Federation, Kirov, Moskovskaya str., 36,
Vyatka State University.
Phone: +7 (8332) 64-50-69. E-mail: byvalov@nextmail.ru

Для цитирования:
Конышев И.В., Дудина Л.Г., Морозова Н.А., Бывалов А.А. Адгезивность специфических бактериофагов к клеткам иерсиний, оцененная методом лазерной ловушки // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 573–578. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-2086

Citation:
Konyshev I.V., Dudina L.G., Morozova N.A., Byvalov A.A. Adhesiveness of the specific phages to yersiniae cells assessed by optical trapping // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 573–578. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-2086

Исследования проведены в рамках темы НИР ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН FUUU-2022-0065 (№ 1021051201894-0), а также гранта Президента РФ для молодых кандидатов наук (№ МК-3383.2021.1.4).

The research was conducted within the framework of the research topic FUUU-2022-0065 (No. 1021051201894-0) of the Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, and the grant of the President of the Russian Federation for young candidates of sciences (No. MK-3383.2021.1.4).

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOT-2086

ADHESIVENESS OF THE SPECIFIC PHAGES TO YERSINIAE CELLS ASSESSED BY OPTICAL TRAPPING

Konyshev I.V.[a,b], Dudina L.G.[a,b], Morozova N.A.[b], Byvalov A.A.[a,b]

[a] *Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation*

[b] *Vyatka State University, Kirov, Russian Federation*

Abstract. In recent years, there has been increasing interest in using bacteriophages in the complex therapy of some infectious diseases. Objectively, it is related to the spread of antibiotic resistance and a small number of side effects triggered by phages applied locally and parenterally. Yersiniae are no exception to this rule, but their interaction with virions has not been studied thoroughly. In Russia, three types of lytic Yersiniae bacteriophages are used for diagnostic purposes, which differ in specificity, virulence, and morphological features. We evaluated the interaction force between phages and bacteriae by optical trapping. *Materials and methods.* Live *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. pestis* cells with different LPS structure and preparations of three bacteriophages — Pokrovskaya's phage, d'Herelle's phage (also named as the pseudotuberculosis phage) and the phage L-413C were used. The Pokrovskaya's phage is well studied and widely used in diagnostics, but the mechanism of its adsorption on *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* cells is not well-understood. The phage L-413C lyses plague bacteria, while d'Herrel's phage can lyse both pathogens. Virions were linked to the surface of aminated glass. Optically trapped microbial cells were approached to the glass surface and then retracted in the opposite direction. The amplitude of the leap was recalculated into force through calibration coefficients. The primary data were processed in the program "R"; statistical analysis was performed using "Matlab 7.0" and "Statistica 12" *Results and discussion.* The analysis of histograms revealed the presence of a specific component in the «*Y. pseudotuberculosis*–d'Herrell's phage» (Fmean = 7.46±3.52 pN) system, as well as in all pairs involving plague microbe. In the latter case, the interaction forces were comparable: 8.64±3.83 pN for d'Herelle's phage, 11.03±4.22 pN for Pokrovskaya's phage, and 10.42±4.79 pN for phage L-413C. The average detachment force from the substrate treated with bovine serum albumin (BSA) was comparable for both cell types. Our results convincingly prove an opportunity for using the optical trapping to estimate interaction force in other «bacterium–phage» systems.

Key words: *phage, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia pestis, sensitization, laser trap.*

Введение

Род *Yersinia* включает три вида патогенных для человека грамотрицательных бактерий: *Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, Y. pestis.* Первые два вида являются энтеропатогенами, входными воротами для которых служит слизистая тонкого кишечника. Передаваясь алиментарным путем (с загрязненной пищей или водой), они вызывают сочетанный энтероколит с поражением Пейеровых бляшек и регионарных лимфатических узлов, нередко переходящий в хроническую форму [12, 15]. У пациентов с иммунодефицитными состояниями отмечается генерализованная септическая форма, смертность от которой составляет около 50% для кишечного иерсиниоза [5] и более 75% для псевдотуберкулеза [6]. Бактерии *Y. pestis* вызывают тяжелое системное заболевание, передаваемое либо через укус блох, либо аэрогенно.

Наряду с симптоматическими средствами в терапии иерсинозов успешно применяются антибиотики — главным образом цефалоспорины, макролиды и фторхинолоны. В последние годы описаны случаи резистентности иерсиний к препаратам налидиксовой кислоты [4]; ампициллину, левомицетину, тетрациклину [11] и доксициклину [3]. В связи с этим актуальна разработка иных, в том числе комбинированных, схем лечения бактериальных инфекций, основанных на использовании бактериофагов наряду с антибиотиками.

Преимуществами фаготерапии можно считать ее высокую специфичность, малую вероятность возникновения побочных эффектов, сохранение нормофлоры кишечника и слизистых оболочек [14]. Разработка средств фаготерапии предполагает проведение всесторонних исследований, включающих изучение механизмов взаимодействия бактериофагов с бактериальной клеткой в условиях *in vitro* и *in vivo.* Это в первую очередь касается идентификации структур на поверхности бактериальной клетки и фаговой частицы, ответственных за их взаимодействие, выявления условий, способствующих такому взаимодействию, количественной оценки силы формируемой связи. Последнее необходимо при обосновании качественного и количественного состава средств фаготерапии, которые, как считается, следует создавать в виде «коктейлей», состоящих из нескольких типов фагов, что должно обеспечивать антибактериальную активность препарата в отношении широкого спектра вирулентных штаммов возбудителя.

В настоящее время известен ряд специфичных в отношении *Y. pestis* литических бактериофагов, которые потенциально могут быть использованы для лечения чумы [7]. Один из них, бактериофаг д'Эрреля, в 20-х гг. прошлого века был успешно применен для лечения бубонной чумы — после введения препарата фага непосредственно в бубоны все четверо больных выздоровели [16]. В связи с разработкой промыш-

ленной технологии эффективных антибиотиков отпала необходимость применения фаготерапии инфекционных заболеваний. Однако появление и распространение в последние десятилетия антибиотикоустойчивости многих бактериальных патогенов, в том числе и *Y. pestis*, вновь возродило интерес к использованию фаготерапии. Появляются работы, свидетельствующие об эффективности применения чумных фагов в отношении бубонной (фаг фА1122) [9] и первично-легочной (фаги фА1122 и PST) [16] форм чумы.

В России в диагностических целях применяются три вида литических иерсиниозных бактериофагов — Покровской, L-413C и псевдотуберкулезный диагностический, различающихся по специфичности, вирулентности, морфологическим свойствам. Эти фаги мы и использовали в настоящей работе для оценки их адгезивности к клеткам *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

Бактериофаг Покровской (семейство *Podoviridae*) считается высоковирулентным в отношении *Y. pestis* [17]. Он также способен лизировать от 6,1 до 19% штаммов псевдотуберкулезного микроба [2]. Рецептор адгезии этого фага расположен на участке HepIII/HepII–HepI/Glc кора ЛПС клеток *Y. pestis* [2].

Бактериофаг L-413C (семейство *Myoviridae*) генетически близок энтеробактериофагу P2 [13]. Из числа чумных фагов считается наиболее специфичным, лизируя подавляющее большинство штаммов *Y. pestis* и не взаимодействуя с клетками *Y. pseudotuberculosis* [2]. Имеет сократимый хвост и изометрическую головку. Рецептор связывания расположен на участке кора ЛПС HepIII/HepII(GlcNAc)–HepI/Glc [7].

Бактериофаг псевдотуберкулезный диагностический (или d'Herelle-m по Filippov и соавт. [8]) относится к семейству *Podoviridae*. Способен лизировать штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Рецептор связывания на поверхности клеток не установлен [10].

Цель работы заключалась в исследовании силы связи между бактериями рода *Yersinia* и специфическими фагами с использованием лазерной ловушки.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали клетки *Y. pseudotuberculosis* (серотип O1b из коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (кат. № 474)) и вакцинный штамм EV *Y. pestis* из коллекции ООО «Агровет», а также бактериофаги диагностический чумной Покровской, диагностический чумной L-413C и диагностический псевдотуберкулезный производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Культивирование бактерий. Для оценки силовых характеристик взаимодействия в системе «бактериофаг–бактериальная клетка» методом лазерной ловушки культуры *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* выращивали на чашках Петри с БТН-агаром («Биотехновация», Россия) в течение ночи при температуре 37°C либо в течение двух суток при температуре 27°C соответственно.

Определение титра бактериофага проводили методом агаровых слоев Грациа [1] с незначительными модификациями. Готовили серию десятикратных разведений бактериофага в буфере SM (0,58% NaCl, 0,2% $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5). В стеклянных пробирках смешивали 1 мл соответствующего разведения бактериофага и 100 мкл суспензии бактерий тест-штамма в концентрации $(2–3) \times 10^8$ м.к./мл. Для адсорбции фаговых частиц на бактериальные клетки пробирки термостатировали на водяной бане при температуре 37°C в течение 20 мин для псевдотуберкулезного диагностического бактериофага, либо в течение 10 мин — для бактериофага Покровской. Затем в пробирки наливали по 3 мл 1,5% БТН-агара (Биотехновация, Россия), предварительно нагретого до температуры 47°C. Содержимое пробирки перемешивали интенсивным вращением в ладонях и выливали на чашки Петри с предварительно подсушенным нижним 3% БТН-агаром. Подсчет бляшек проводили для *Y. pseudotuberculosis* через 17–20 ч культивирования при температуре 37°C, для *Y. pestis* штамма EV — через 40–48 ч при температуре 27°C.

Сенсибилизация подложек вирионами фагов. Использовали пластиковые чашки «Fluorodish» (WPI, Германия) со стеклянным дном, которые предварительно подвергали процедуре аминирования. Для этого в отдельной емкости смешивали 10 мкл триэтиламина (Реахим, Россия) и 30 мкл 3-аминопропил-триэтоксисилана (APTES) (Sigma Aldrich, США), после чего помещали ее вместе с чашками в эксикатор и выдерживали в атмосфере аргона в течение 1,5 ч. Далее на поверхность чашек наносили последовательно 0,6 мкл EDC (Sigma Aldrich, США), 900 мкл фосфатного буферного раствора (ФБР), 30 мкл 0,46%-ного раствора N-гидроксисукцинимида (Sigma Aldrich, США) и 100 мкл суспензии того или иного фага в концентрации 1×10^{11} БОЕ/мл. Инкубировали чашки 2 ч при комнатной температуре, пятикратно промывали деионизованной водой и блокировали 1%-ным раствором БСА на ФБР 1 ч. Повторяли промывку, осушали и хранили чашки в закрытом эксикаторе при температуре 4–6°C. Чашку «БСА» готовили так же, добавляя вместо фаговых препаратов равный объем 1%-ного БСА в ФБР.

Лазерный пинцет. Для оценки сил взаимодействия в модельной системе «микросфера — подложка» использовали лазерный пинцет JPK Nanotracker™ (JPK, Германия) на основе

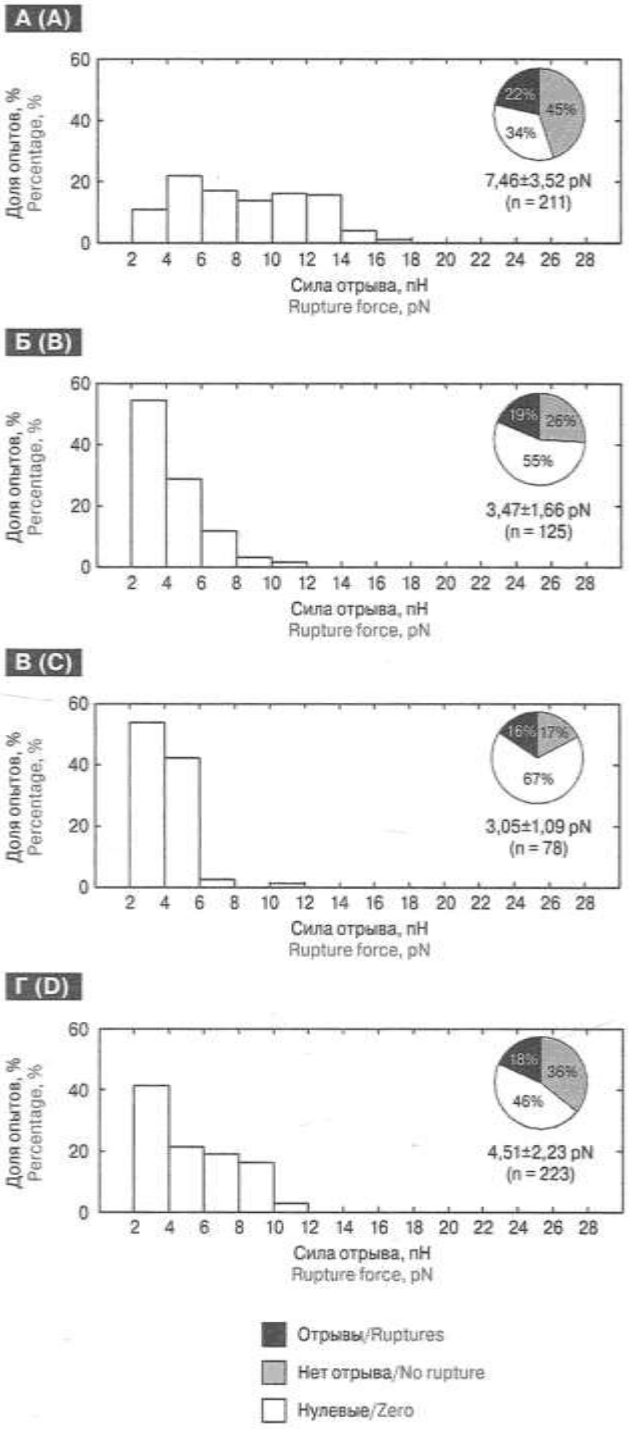


Рисунок 1. Гистограммы распределения сил отрыва в системе «бактериофаг–бактериальная клетка» с указанием их средних значений и соотношения исходов взаимодействия для клеток *Y. pseudotuberculosis*

Figure 1. Histograms of rupture forces distribution in the «phage–bacterium» system with average values and outcomes ratio for *Y. pseudotuberculosis* cells

Примечание. А — фаг д'Эрреля, Б — фаг Покровской, В — фаг L-413C, Г — БСА.

Note. A — d'Errel's phage, B — Pokrovskaya's phage, C — phage L-413C, D — BSA.

иттрий-гранатового источника инфракрасного излучения ($\lambda = 1064$ нм). Непосредственно перед проведением эксперимента в чашку «Flurodish», сенсибилизированную одним из трех бактериофагов, приливали 2,5 мл ФБР и 2–4 мкл микробной суспензии в концентрации 6×10^9 м.к./мл. Тщательно перемешивали содержимое чашки и устанавливали ее на термостатируемую платформу с температурой +37°С.

Методика оценки сил межмолекулярного взаимодействия включала захват бактерий лазерной ловушкой при мощности лазера 1,2 Вт. Бактериальную клетку подводили ко дну чашки таким образом, чтобы расстояние между ними составляло около 1 мкм. С помощью пьезостолика прецизионно перемещали чашку в направлении неподвижной клетки с шагом 20 нм до момента их соприкосновения, который определяли по трем последовательным скачкам на хронограмме сигнала. Спустя 1 с после остановки запускали процесс отведения пьезостолика в обратном направлении в полуавтоматическом режиме со скоростью около 150 нм/с. Момент разрыва связи детектировали по скачкообразному изменению сигнала на хронограмме. Для пересчета первичного сигнала детектора в единицы силы применяли полученные ранее для полистирольных микросфер d = 1 мкм калибровочные коэффициенты чувствительности детектора (6,4 мВ/нм) и жесткости ловушки (0,26 пН/нм).

Первичные данные сохраняли в виде текстовых файлов, которые затем обрабатывали с использованием специализированного программного обеспечения JPK Processing. Статистический анализ проводили с использованием пакетов программ R, MatLab 7.0 и Statistica 12.

Результаты и обсуждение

Гистограммы распределения сил разрыва связи между фагами трех штаммов и клетками двух видов иерсиний приведены на рис. 1 и 2. При использованных условиях эксперимента возможны три варианта исхода измеряемого взаимодействия: 1 — разрыв формируемой связи, 2 — «залипание» микробной клетки на поверхности покрытого бактериофагом дна чашки, когда мощности ловушки недостаточно для разрыва связи, 3 — чрезвычайно слабое связывание, когда скачок сигнала отсутствует или не превосходит уровень «шума». На рис. 1 и 2 эти исходы обозначены как «отрывы», «нет отрыва» и «нулевые» соответственно.

Существенные отличия в средней силе отрыва от стекла, покрытого разными фагами, отмечены для клеток *Y. pseudotuberculosis*, которые, как видно из рис. 1, специфически связывались

только с фагом д'Эрреля (Fср. = 7,46±3,52 пН). В остальных группах значение показателя составило 4,51±2,23 пН (в группе «БСА»), а для двух других фагов было даже меньше — 3,05±1,09 пН для фага L-413C и 3,47±1,66 пН для фага Покровской. Средняя сила связи для чашки, обработанной фагом д'Эрреля, оказалась достоверно ($p < 0,01$) выше по сравнению с чашками, покрытыми двумя другими фагами и БСА. Доля «нулевых» исходов оказалась заметно выше для фагов L-413C (67%) и Покровской (55%), чем для фага д'Эрреля (34%). Доля зафиксированных отрывов в указанных группах менялась слабо и составила 16–22%. В контрольных группах («фаг Покровской», «L-413C», «БСА») более 80% отрывов лежали в диапазоне от 2 до 8 пН, в то время как в группе «фаг д'Эрреля» гистограмма смещалась вправо, достигая диапазона 16–18 пН.

Иная картина наблюдалась при работе с клетками *Y. pestis*. Средняя сила отрыва для чашек, обработанных тремя фагами, была выше сил, отмеченных для клеток *Y. pseudotuberculosis* (рис. 1, 2). Ожидаемо высокой была доля необратимых связываний для «фаговых» подложек (46–60%) против 32% для «БСА». «Нулевые» опыты преобладали только в группе «БСА» (57%), в остальных случаях доля таких событий не превышала 25% («фаг Покровской») или была заметно ниже («фаг д'Эрреля). Гистограммы при использовании трех фагов отличались незначительно (рис. 2).

Таким образом, нами дана количественная оценка силы взаимодействия клеток двух видов иерсиний со специфическими бактериофагами методом оптической ловушки. Представленные результаты подтверждают данные литературы о высокой специфичности фагов Покровской и L-413C и неспособности фага д'Эрреля дифференцировать два близкородственных вида иерсиний — *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, полученные с помощью микробиологических методов [8].

В настоящее время механизмы полного цикла взаимодействия микробной клетки иерсиний и специфических бактериофагов изучены недостаточно. В доступной литературе нет сведений об оценке адгезии фагов к поверхности иерсиний методом оптической ловушки. Ранее лазерный пинцет применялся лишь для изучения молекулярных взаимодействий между отдельными вирионами и минеральными подложками либо клетками эукариот. Предстоят дальнейшие исследования и начальных стадий такого взаимодействия, в том числе первичного контакта фага с рецепторным аппаратом бактерии с использованием молекулярно-генетических, иммунохимических, микробиологических, биофизических методов с целью разработки новых средств фаготерапии.

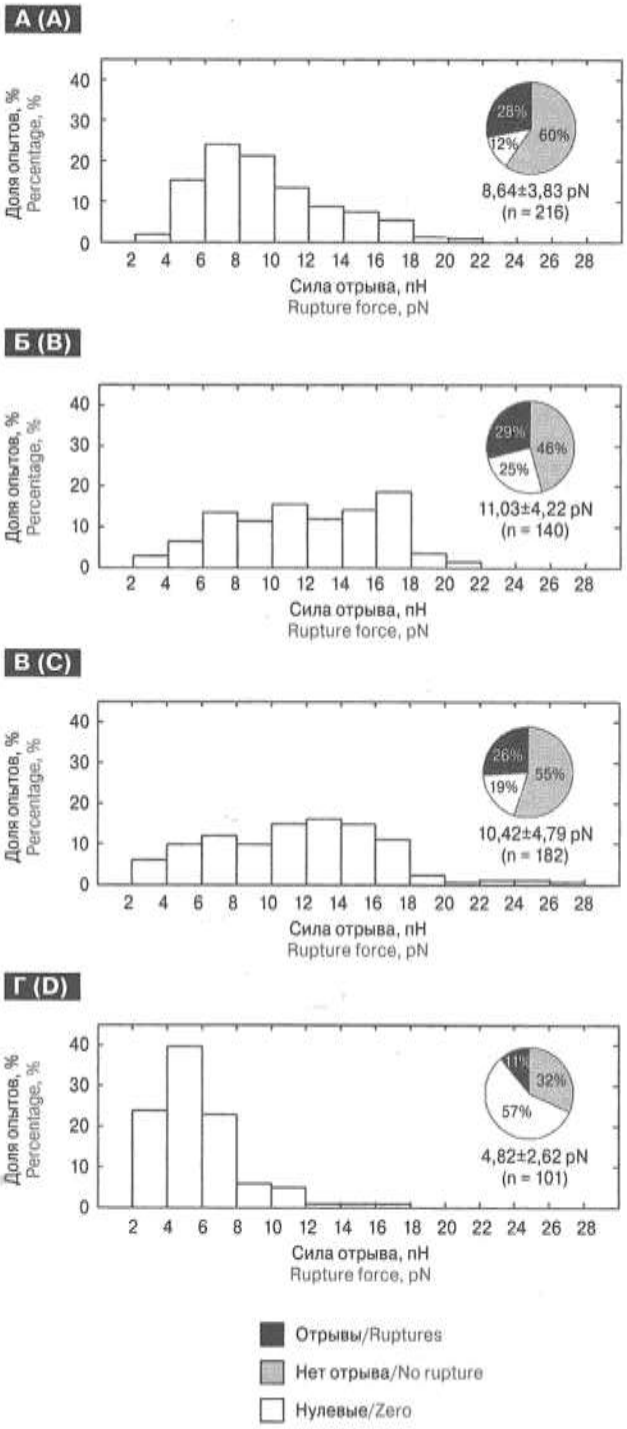


Рисунок 2. Гистограммы распределения сил отрыва с указанием их средних значений и соотношения исходов взаимодействия для клеток *Y. pestis* EV

Figure 2. Histograms of rupture forces distribution in the «phage–bacterium» system with average values and outcomes ratio for *Y. pestis*

Примечание. А — фаг д'Эрреля, Б — фаг Покровской, В — фаг L-413C, Г — БСА.

Note. A — d'Errel's phage, B — Pokrovskaya's phage, C — phage L-413C, D — BSA.

Список литературы/References

1. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 394 с. [Labinskaya A.S. Microbiology and methods of microbiology. *Moscow: Meditsina, 1978. 394 p. (In Russ.)*]
2. Филиппов А.А., Эллиотт Дж.М., Бобров А.Г., Кириллина О.А., Мотин В.Л., Чейн П.С., Гарсия Э. Определение нуклеотидной последовательности генома чумного диагностического бактериофага L-413C // Проблемы особо опасных инфекций. 2005, № 2. С. 49–52. (Filippov A.A., Elliott J.M., Bobrov A.G., Kirillina O.A., Motin V.L., Cheyne P.S., Garcia E. Determination of the nucleotide sequence of the genome of the plague diagnostic bacteriophage L-413C. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2005, no. 2, pp. 49–52. (In Russ.)*]
3. Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a Yersinia pestis strain isolated from a rat. *Int. J. Antimicrob. Agents., 2008, vol. 51, pp. 249–254. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015*
4. Capilla S., Ruiz J., Goñi P., Castillo J., Rubio M.C., Jiménez de Anta M.T., Gómez-Lus R., Vila J. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistance in Yersinia enterocolitica O:3 clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother., 2004, vol. 53, pp. 1068–1071. doi: 10.1093/jac/dkh22.5*
5. Cover T.L., Aber R.C. Yersinia enterocolitica. *N. Engl. J. Med., 1989, vol. 321, pp. 16–24. doi: 10.1056/NEJM198907063210104*
6. Deacon A.G., Hay A., Duncan J. Septicemia due to Yersinia pseudotuberculosis — a case report. *Clin. Microbiol. Infect., 2003, vol. 9, pp. 1118–1119. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00746.x*
7. Filippov A.A., Sergueev K.V., He, Y., Huang X.-Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. Bacteriophage-resistant mutants in Yersinia pestis: identification of phage receptors and attenuation for mice. *PLoS One, 2011, vol. 6., no. 9: e25486. doi: 10.1371/journal.pone.0025486*
8. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Nikolich M.P. Bacteriophages capable of lysing Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis: efficiency of plating tests and identification of receptors in Escherichia coli K-12. *Adv. Exp. Med. Biol., 2012, pp. 123–134. doi: 10.1007/978-1-4614-3561-7_16*
9. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. Bacteriophage therapy of experimental bubonic plague in mice. *Adv. Exp. Med. Biol., 2012, vol. 954, pp. 337–348. doi: 10.1007/978-1-4614-3561-7_41*
10. Filippov A.A., Sergueev K.V., Nikolich M.P. Can phage effectively treat multidrug-resistant plague? *Bacteriophage, 2012, vol. 2, pp. 186–189. doi: 10.4161/bact.22407*
11. Galimand M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of Yersinia pestis to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother., 2006, vol. 50, pp. 3233–3236. doi: 10.1128/AAC.00306-06*
12. Galindo C.L., Rosenzweig J.A., Kirtley M.L., Chopra A.K. Pathogenesis of Y. enterocolitica and Y. pseudotuberculosis in Human Yersiniosis. *J. Pathog., 2011: 182051. doi: 10.4061/2011/182051*
13. Garcia E., Chain P., Elliott J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O., Lao V., Calendar R., Filippov A.A. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage. *Virology, 2008, vol. 372, no. 1, pp. 85–96. doi: 10.1016/j.virol.2007.10.032*
14. Górski A., Międzybrodzki R., Jończyk-Matysiak E., Borysowski J., Letkiewicz S., Weber-Dąbrowska B. The fall and rise of phage therapy in modern medicine. *Expert. Opin. Biol. Ther., 2019, vol. 19, pp. 1115–1117. doi: 10.1080/14712598.2019.1651287*
15. Hill A.A., Diehl G.E. The infectious cause of the chronic effect. *Cell Host Microbe, 2015, vol. 18, pp. 383–385. doi: 10.1016/j.chom.2015.09.011*
16. Vagima Y., Gur D., Aftalion M., Moses S., Levy Y., Makovitzki A., Holtzman T., Oren Z., Segula Y., Fatelevich E., Tidhar A., Zauberman A., Rotem S., Mamroud E., Steinberger-Levy I. Phage therapy potentiates second-line antibiotic treatment against pneumonic plague. *Viruses, 2022, vol. 14: 688. doi: 10.3390/v14040688*
17. Zhao X., Skurnik M. Bacteriophages of Yersinia pestis. *Adv. Exp. Med. Biol., 2016, vol. 918, pp. 361–375. doi: 10.1007/978-94-024-0890-4_13*

Авторы:

Конышев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия; доцент кафедры биотехнологии Института биологии и биотехнологии ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия;

Дудина Л.Г., к.б.н., доцент кафедры биотехнологии Института биологии и биотехнологии ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия; младший научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия;

Морозова Н.А., студент, магистрант кафедры биотехнологии Института биологии и биотехнологии ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия;

Бывалов А.А., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник Центра превосходства «Фармацевтическая биотехнология» ФБОУ ВО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия; зав. лабораторией физиологии микроорганизмов Института физиологии ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, Россия.

Authors:

Konyshev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation; Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Dudina L.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation;

Morozova N.A., MD Student, Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Byvalov A.A., DSc (Medicine), Professor, Senior Researcher, Center of Excellence "Pharmaceutical Biotechnology", Vyatka State University, Kirov, Russian Federation; Head of the Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.12.2022
Принята к печати 21.06.2023

Received 02.12.2022
Accepted 21.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 579–585

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 579–585

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ TLR3 И TLR7 ПРИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

С.Г. Горбунов, Л.Н. Мазанкова, А.Н. Оськин

ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Ротавирусная инфекция является актуальной проблемой для детской инфектологии. Заболевание не всегда протекает гладко, предполагается, что важную роль в его прогнозе играют TLR3 и TLR7. Исходное количество клеток, экспрессирующих эти рецепторы, у детей раннего возраста, вероятно, может считаться предиктором неблагоприятного течения и исходов ротавирусной инфекции. *Материалы и методы.* Дети с ротавирусной инфекцией были разделены на группы в зависимости от исходного количества иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7. Все пациенты обследованы с применением общеклинических методов. Диагноз ротавирусной инфекции установлен молекулярно-генетическим методом (определение РНК с помощью ПЦР) и иммунохроматографически (определение антигена). Показатели клеточного иммунитета определялись методом проточной цитометрии. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы Statistica 8.0 для независимых выборок с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и χ^2 критерия Пирсона. *Результаты.* Установлено, что у пациентов с исходно малым количеством клеток, экспрессирующих TLR3, симптомы эксикоза наблюдались достоверно дольше по сравнению с детьми, у которых количество этих клеток было большим, что определяло достоверно более длительную инфузионную регидратационную терапию. У пациентов с исходно малым количеством клеток, экспрессирующих TLR7, существенных различий в течении заболевания не отмечалось, однако только им, как и детям с небольшим количеством клеток, экспрессирующих TLR3, в курс лечения добавляли антибиотики по причине присоединения к ротавирусу бактериальной флоры. Только у реконвалесцентов с малым количеством клеток, экспрессирующих как TLR3, так и TLR7, в катамнезе наблюдались повторные эпизоды ОРИ и аллергические заболевания, а у детей с исходно низким количеством клеток, экспрессирующих TLR3, кроме того развивался неблагоприятный исход в виде реактивной панкреатопатии. *Заключение.* Исходно низкое количество иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7, приводит к более тяжелому течению ротавирусной инфекции у детей раннего возраста, требующему коррекции терапии с включением антибактериальных средств, а также способствует формированию в ряде случаев неблагоприятных исходов и последствий этого заболевания в катамнезе на протяжении 6–12 месяцев.

Ключевые слова: *ротавирусная инфекция, клиническая картина, исходы заболевания, TLR, дети раннего возраста, иммунокомпетентные клетки.*

Адрес для переписки:
Горбунов Сергей Георгиевич
123995, Россия, Москва, ул. Баррикадная, 2/1,
ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования.
Тел.: 8 (495) 949-17-22.
E-mail: gsgsg70@mail.ru

Contacts:
Sergey G. Gorbunov
123995, Russian Federation, Moscow, Barrikadnaya str., 2/1,
Russian Medical Academy of Continuig Professional Education.
Phone: +7 (495) 949-17-22.
E-mail: gsgsg70@mail.ru

Для цитирования:
Горбунов С.Г., Мазанкова Л.Н., Оськин А.Н. Прогностическая роль TLR3 и TLR7 при ротавирусной инфекции у детей раннего возраста // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 579–585. doi: 10.15789/2220-7619-TAT-2045

Citation:
Gorbunov S.G., Mazankova L.N., Os'kin A.N. TLR3 and TLR7 prognostic role in early pediatric rotavirus infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 579–585. doi: 10.15789/2220-7619-TAT-2045

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TAT-2045

TLR3 AND TLR7 PROGNOSTIC ROLE IN EARLY PEDIATRIC ROTAVIRUS INFECTION

Gorbunov S.G., Mazankova L.N., Os'kin A.N.

Russian Medical Academy of Continuig Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Rotavirus infection is an urgent problem for pediatric infectology. The disease does not always proceed smoothly, it is assumed that TLR3 and TLR7 play an important role in its prognosis. The initial number of cells expressing such receptors in early children can probably be considered a predictor of unfavorable course and outcomes of rotavirus infection. *Materials and methods.* Infants with rotavirus infection were divided into groups depending on the initial count of TLR3- and TLR7-expressing immunocompetent cells. All patients were examined using general clinical methods. Rotavirus infection was diagnosed by molecular genetic (RNA detected by PCR) and immunochromatographic (determination of antigen) method. Parameters of cellular immunity were assessed by flow cytometry. Statistical data processing was carried out using the Statistica 8.0 program for independent samples using the nonparametric Mann–Whitney criterion and the Pearson criterion χ^2. *Results.* It was found that in patients with an initially small vs. high count of TLR3-expressing cells, the symptoms of exicosis were observed significantly longer, which determined a significantly longer infusion rehydration therapy. In patients with an initially small count of TLR7-expressing cells, no significant differences were observed during disease course. However, only this group similar to infants with a small count of TLR3-expressing cells were treated with antibiotics due to concomitant bacterial infections. Only convalescents with small count of simultaneously TLR3- and TLR7-expressing cells had repeated episodes of ARI and allergic diseases in catamnesis, whereas infants with extremely low count of TLR3-expressing cells developed additionally an unfavorable outcome such as reactive pancreatopathy. *Conclusion.* The initially low count of TLR3- and TLR7-expressing immunocompetent cells leads to a more severe course of rotavirus infection in infants requiring adjusted therapy by introducing antibacterial drugs and in some cases also contributes to arising adverse outcomes and consequences in 6–12 month catamnesis.

Key words: *rotavirus infection, clinical picture, disease outcomes, TLR, infants, immunocompetent cells.*

Введение

Ротавирусная инфекция сохраняет лидирующие позиции среди острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей в возрасте до 5 лет не только в России, но и во всем мире, несмотря на внедрение в ряде стран вакцинации против этого заболевания [2, 8]. По данным Роспотребнадзора показатель заболеваемости ротавирусной инфекцией в нашей стране в 2021 г. составил 49,77 на 100 тыс. населения, что на 46,6% больше по сравнению с предыдущим годом. Особенно высока заболеваемость среди детей до 1 года (593,48 на 100 тыс.) и 1–2 лет (890,49 на 100 тыс.), при этом охват вакцинацией целевой когорты составил всего 6,23% [1]. Приведенные статистические данные свидетельствуют о высокой медицинской и социальной значимости ротавирусной инфекции для здравоохранения многих стран, в том числе и Российской Федерации.

В патогенезе ротавирусной инфекции ведущую роль играет прямое цитопатическое действие возбудителя на зрелые энтероциты с развитием атрофии их ворсинок и гибелью клеток слизистой оболочки тонкой кишки. Процесс внедрения ротавируса начинается с преодоления защитного слоя слизи, взаимодействия с молекулами клеточной мембраны энтероцитов (сиаловой кислотой, интегринами и пр.) и кишечной микробиотой, что в конечном итоге ведет к поражению слизистой оболочки. При этом энтероциты, противостоя инфекции, задействуют ряд факторов врожденной иммунной защиты для предотвращения инвазии ротавируса, одним из которых является передача сигнала Toll-подобных рецепторов (TLR) [2].

TLR относятся к ведущим структурам врожденного клеточного иммунитета, распознающим различные патогены, в том числе и ротавирусы. Наибольшее значение в определении РНК ротавируса играют TLR3 и TLR7. Их активация координирует длительный адаптивный иммунный ответ на инфекционный агент. Однако при этом возможна активация провоспалительных цитокинов, что ведет в конечном итоге к повреждению энтероцитов. Активация TLR3 индуцирует, кроме того, хемокины и IFN I типа. В эксперименте на мышах, у которых отсутствовали TLR3, установлено снижение выработки IFN I типа и более высокая вирусная нагрузка при заражении ротавирусом по сравнению с дикими мышами [6]. Ингибитор TLR3 норкураринол (лавандулированный флаванон, выделенный из корней растения *Sophora flavescens*) способен подавлять цитопатические эффекты, вызванные ротавирусом, и влиять на его репликацию, что открывает новые перспективы в поиске эффективных этиотропных препаратов для лечения ротавирусной инфекции [5].

Проведенные на сегодняшний день исследования показали, что TLR-зависимая передача сигналов в дендритных клетках участвует в процессе секреции IFN I типа при ротавирусной инфекции. Заражение плазмоцитоидных дендритных клеток ротавирусом приводит к эндосомозависимой (и, возможно, опосредо-

ванной TLR7) секреции IFN I типа, которая запускается вирусной двухцепочечной РНК. На центральную роль TLR-зависимой защиты от ротавируса также указывает тот факт, что отсутствие MyD88 (важного адаптерного белка, участвующего в передаче сигналов от различных TLR) приводит к повышению вирулентности этого возбудителя, тяжести диареи и нарушению гуморального иммунитета [8].

Способность TLR3 распознавать ротавирус и, таким образом, формировать иммунный ответ связана с возрастозависимой экспрессией TLR3 в кишечнике. Поскольку ротавирусная инфекция обычно протекает более тяжело в раннем детском возрасте, что совпадает с более низким уровнем в данной группе пациентов экспрессии TLR3 по сравнению со взрослыми, одной из возможных причин этого является усиление с возрастом передачи сигналов TLR3 в энтероцитах [7]. Установлено, что низкая экспрессия TLR3 способствует восприимчивости к ротавирусной инфекции [3]. TLR3 и TLR7 влияют на выработку антител класса IgA и сероконверсию к вакцине «Rotarix» [4]. Следовательно, данные типы рецепторов могут играть важную роль не только в течении ротавирусной инфекции, но и определять в известной мере исходы этого заболевания у детей.

Цель исследования — определить значение TLR3 и TLR7 у детей раннего возраста с ротавирусной инфекцией как предикторов неблагоприятного течения и исходов заболевания.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением в ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗМ и ГБУЗ «ДГКБ им. З.А. Башляевой» ДЗМ в 2020–2021 гг. находилось 20 детей от 1 месяца до 3 лет с ротавирусной инфекцией средней тяжести, которые были разделены на несколько групп в зависимости от исходного количества у них иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7. Эти клетки определялись в первые сутки госпитализации методом проточной цитометрии на приборе «Navios™ BC» с использованием реагентов фирмы «Beckman Coulter» сотрудниками кафедры клинической лабораторной диагностики Академического образовательного центра ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (проф. С.А. Луговская, доц. Е.В. Наумова, доц. М.Е. Почтарь). Средние уровни количества иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7, у практически здоровых детей возраста от 1 месяца до 3 лет были определены ими ранее (0,6 (0,5–0,7) и 0,7 (0,6–0,8) соответственно, в абсолютном выражении).

Диагноз ротавирусной инфекции устанавливался путем обнаружения в фекалиях РНК ротавируса методом ПЦР и антигена данного микроорганизма методом иммунохроматографии в лабораториях указанных стационаров. Кроме того, всем пациентам с ротавирусной инфекцией проводилось общеклиническое динамическое обследование, клинические анализы крови и мочи, биохимический анализ крови, ионограмма, определение кислотно-щелочного состояния (КЩС), бактериологический посев кала, копрограмма, УЗИ органов брюшной полости, по показаниям пациенты консультированы аллергологом, оториноларингологом, пульмонологом. После выписки из стационара за детьми устанавливалось катамнестическое наблюдение на 6–12 месяцев, в течение которых регистрировался характер стула, наличие в нем патологических примесей, количество эпизодов острых респираторных инфекций (ОРИ), аллергических заболеваний и патологии со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

У всех обследуемых детей исключались сопутствующие тяжелые соматические заболевания в стадии декомпенсации, наследственные генетические заболевания, иммунодефицитные состояния, а также прием антибактериальных и/или иммуномодулирующих препаратов, пробиотиков за 1 месяц до настоящего исследования. Пациенты с ротавирусной инфекцией получали комплексное лечение согласно официально утвержденным стандартам и клиническим рекомендациям, а также дополнительно препарат человеческого рекомбинантного α2b-интерферона (ВИФЕРОН®, ООО «Ферон», Россия) по 150 тыс. МЕ 2 р/сут курсом 5 дней ректально. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом.

Количественные признаки выражали в виде среднего значения показателей (M) и стандартной ошибки (m). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 для независимых выборок с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и χ^2 критерия Пирсона.

Результаты

Исходя из количества иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 ($CD3^+/TLR3^+$), пациенты были разделены на 2 группы — с низким (17 человек) и высоким (3 человека) их уровнем. Длительность основных клинических симптомов заболевания у них представлена на рис. 1.

Оказалось, что продолжительность лихорадки, интоксикации, снижения тургора мягких тканей, жажды, метеоризма, диареи и олигурии в обеих группах существенно не отличались. В 2 раза более продолжительная рвота наблюдалась у пациентов с низким содержанием $CD3^+/$

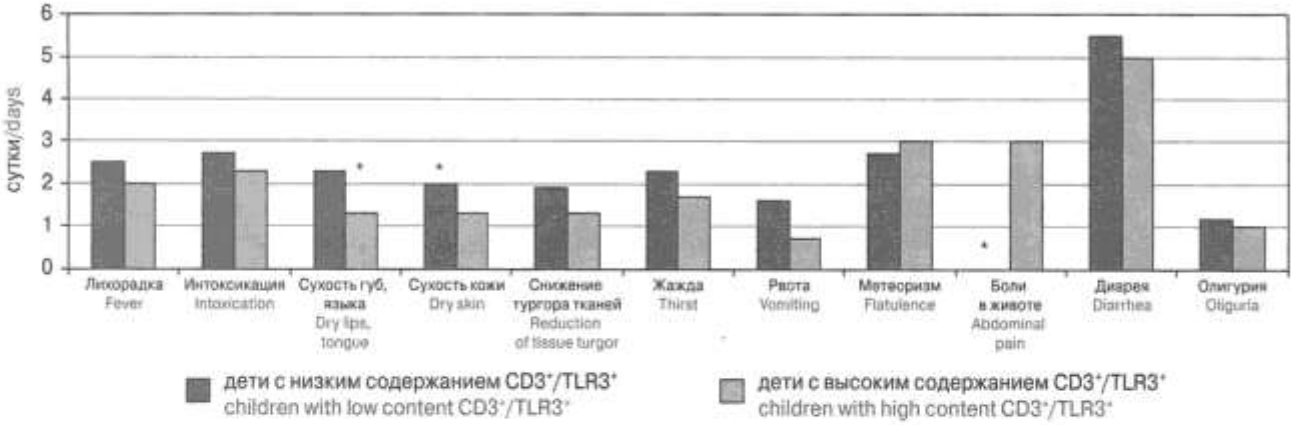


Рисунок 1. Длительность клинических симптомов ротавирусной инфекции у детей с различным содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3

Figure 1. Duration of clinical symptoms of rotavirus infection in children with different levels of TLR3-expressing immunocompetent cells

Примечание. * — $p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни между исследуемыми группами.
Note. * — $p < 0.05$ according to the χ^2 Pearson criterion and the Mann–Whitney criterion between the study groups.

TLR3+ (1,6 (1,4–1,8) против 0,7 (0,0–1,4) суток), однако эта разница не была достоверной. Такие симптомы, как сухость губ, языка и кожи, достоверно дольше сохранялись в этой же группе (соответственно, 2,3 (2,2–2,4) против 1,3 (1,0–1,6) и 2,0 (1,9–2,1) против 1,3 (1,0–1,6) суток при $p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни). При этом боли в животе были характерны только для детей с высоким содержанием клеток, экспрессирующих TLR3, в течение 3,0 (0,0–6,0) суток. Обращал на себя внимание тот факт, что в группе пациентов с низким содержанием CD3+/TLR3+ максимальная частота стула оказалась немного меньше (5,8 (4,7–6,9) против 7,7 (5,5–9,9) р/сут), а максимальная частота рвоты и выраженность лихорадки больше (соответственно, 6,3 (5,3–7,3) против 1,7 (0,0–3,4) р/сут и 38,3°C (38,1–38,5) против 37,1 (36,9–37,3)°C) по сравнению с группой детей, у которых количество иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3, было высоким, хотя данные различия не являлись достоверными. В гемограмме достоверных различий между группами не зарегистрировано, хотя и наблюдалось некоторое преобладание общего количества лейкоцитов и нейтрофилов при незначительно меньшем количестве лимфоцитов у пациентов с низким содержанием CD3+/TLR3+ относительно пациентов с высоким содержанием клеток, экспрессирующих TLR3 (табл. 1). Количество моноцитов в обеих группах было практически одинаковым.

Таблица 1. Гемограмма пациентов с ротавирусной инфекцией с различным содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3

Table 1. Hemogram of patients with rotavirus infection with different contents of immunocompetent cells expressing TLR3

Показатель Indicator	**Дети с низким содержанием CD3+/TLR3+** Children with low CD3+/TLR3+ level **(n = 17)**	**Дети с высоким содержанием CD3+/TLR3+** Children with high CD3+/TLR3+ level **(n = 3)**
Лейкоциты, 10^9/л Leukocytes, 10^9/l	9,6 (8,4–10,8)	8,8 (1,3 (7,5–10,1)
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	53,3 (49,1–57,5)	43,5 (39,1–47,9)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	22,6 (19,5–25,7)	32,2 (15,3–49,1)
Моноциты, % Monocytes, %	6,9 (6,0–7,8)	6,4 (5,0–7,8)

Примечание. Достоверных различий нет.
Note. No significant differences.

Учитывая более продолжительное сохранение признаков эксикоза в группе детей с низким содержанием CD3+/TLR3+, вполне логично, что длительность инфузионной терапии у них, проводимой с целью регидратации и дезинтоксикации, оказалась достоверно выше по сравнению с детьми, у которых количество иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3, было высоким — 3,0 (2,7–3,3) против 0,7 (0,0–1,4) суток ($p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни). Также лишь в этой группе к проводимому лечению была добавлена антибактериальная терапия на протяжении 2,1 (1,4–2,8) суток по причине присоединения к ротавирусу бактериальной флоры, что выражалось в появлении на 2–3 день с момента госпитализации у пациентов патологических примесей — зелени и слизи — в кале, сохранении лихорадки.

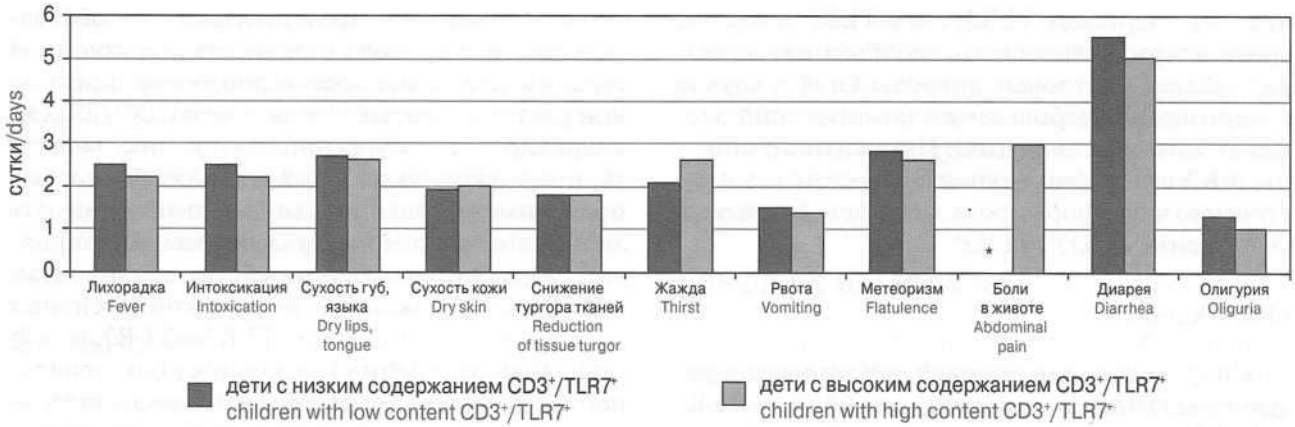


Рисунок 2. Длительность клинических симптомов ротавирусной инфекции у детей с различным содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR7

Figure 2. Duration of clinical symptoms of rotavirus infection in children with different levels of TLR7-expressing immunocompetent cells

Примечание. * — $p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни между исследуемыми группами.

Note. * — $p < 0.05$ according to the χ^2 Pearson criterion and the Mann–Whitney criterion between the study groups.

Для оценки количества $CD3^+/TLR7^+$ у этих же 20 наблюдаемых нами детей с ротавирусной инфекцией, их также разделили на 2 группы в зависимости от уровня экспрессии TLR7 — с низким (15 человек) и высоким (5 человек) уровнем экспрессии. Длительность основных клинических симптомов заболевания у них представлена на рис. 2.

Как видно, продолжительность лихорадки, интоксикации, признаков эксикоза и симптомов поражения ЖКТ в обеих группах оказалась практически идентичной. Только боли в животе наблюдались лишь у пациентов с высоким содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR7 — 3,0 (0,0–6,0) суток ($p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни). Максимальная частота стула (6,0 (4,8–7,2) против 6,4 (4,4–8,4) р/сут) и рвоты (5,9 (4,7–7,1) против 4,6 (3,0–6,2) р/сут), а также степень выраженности лихорадки (38,0 (37,8–38,2)°С против 38,4 (37,8–39,0)°С) в обеих группах существенно не различались. В гемограмме детей этой группы количество моноцитов было немного ниже нормы и достоверно меньше по сравнению с пациентами, у которых содержание $CD3^+/TLR7+$ являлось низким (табл. 2).

Продолжительность инфузионной терапии оказалась у детей с низким содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR7, почти на сутки дольше относительно пациентов с высоким их содержанием — 2,9 (2,5–3,3) против 2,0 (1,1–2,9) суток (различия недостоверны). При этом антибактериальные средства были добавлены на 2,5 (1,8–3,2) сутки к комплексному лечению, включающему интерферонотерапию, только детям с низким содержанием $CD3^+/TLR7^+$ из-за развития микстинфекции за счет присоединения бактериальных возбудителей, о чем свидетельствовало появление в стуле примесей зелени и слизи ($p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни).

После купирования острой фазы заболевания пациенты выписывались из стационара, и за ними на протяжении 6–12 месяцев устанавливалось катамнестическое наблюдение, результаты которого представлены в табл. 3.

Выявлено, что только у детей с низким содержанием иммунокомпетентных клеток, экс-

Таблица 2. Гемограмма пациентов с ротавирусной инфекцией с различным содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR7

Table 2. Hemogram of patients with rotavirus infection with varying TLR7-expressing immunocompetent cell level

Показатель Indicator	**Дети с низким содержанием $CD3^+/TLR7^+$** Children with low $CD3^+/TLR7^+$ level **(n = 15)**	**Дети с высоким содержанием $CD3^+/TLR7^+$** Children with high $CD3^+/TLR7^+$ level **(n = 5)**
Лейкоциты, 10^9/л Leukocytes, 10^9/l	9,1 (7,9–10,3)	10,7 (8,8–12,6)
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	53,9 (49,4–58,4)	45,4 (39,6–51,2)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	21,2 (18,2–24,2)	32,7 (22,2–43,2)
Моноциты, % Monocytes, %	7,8 (6,9–8,7)	3,7 (3,2–4,2)*

Примечание. * — $p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни между исследуемыми группами.

Note. * — $p < 0.05$ inter-group difference according to χ^2 Pearson criterion and Mann–Whitney criterion.

прессирующих как TLR3, так и TLR7, в течение срока катамнестического наблюдения регистрировались повторные эпизоды ОРИ и случаи аллергических заболеваний (атопический дерматит, пищевая аллергия). Патология со стороны ЖКТ в виде реактивной панкреатопатии достоверно чаще формировалась у детей с низким содержанием $CD3^+/TLR3^+$.

Обсуждение

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о важной роли TLR3 и TLR7 в течении и исходах ротавирусной инфекции у детей раннего возраста. В частности показано, что заболевание протекает с более выраженными симптомами эксикоза у пациентов с низким содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3. Тот факт, что боли в животе наблюдались лишь у детей с высоким содержанием $CD3^+/TLR3^+$ и $CD3^+/TLR7^+$, на наш взгляд не является характерной особенностью, а обусловлен, скорее всего, немногочисленностью пациентов в этих группах. Этим же обстоятельством, вероятно, можно объяснить меньшее количество моноцитов в гемограмме у детей с высоким содержанием клеток, экспрессирующих TLR7, по сравнению с пациентами, у которых оно было высоким.

Немаловажным представляется то обстоятельство, что продолжительность инфузионной терапии оказалась достоверно более длительной у детей с низким содержанием $CD3^+/TLR3^+$, коррелируя с выраженностью у них эксикоза, о чем сказано выше. Другой особенностью проводимого лечения явилась необходимость добавления к комплексу лечебных мероприятий антибактериальных средств пациентам с низким содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7, вследствие присоединения к ротавирусу бактериальной флоры на 2–3 день с момента госпитализации, что выражалось в появлении зелени и слизи в кале, сохранении лихорадки.

Катамнестическое наблюдение в течение 6–12 месяцев за детьми, перенесшими ротавирусную инфекцию, продемонстрировало, что неблагоприятное течение данного периода имело место в группах, у которых было низкое содержание $CD3^+/TLR3^+$ и $CD3^+/TLR7^+$. Можно предположить, что как более тяжелое течение заболевания в острый период, так и негладкое течение в катамнезе с формированием неблагоприятных исходов со стороны ЖКТ у детей в этих группах обусловлено значительной вирусной нагрузкой относительно пациентов с высоким содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих оба типа исследуемых TLR [6].

Таблица 3. Результаты катамнестического наблюдения за детьми, перенесшими ротавирусную инфекцию, с различным содержанием иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7
Table 3. Results of catamnestic observation of children with rotavirus infection with varying level of TLR3- and TLR7-expressing immunocompetent cells

Показатель, % Indicator, %	**Дети с низким содержанием $CD3^+/TLR3^+$** Children with low $CD3^+/TLR3^+$ level **(n = 17)**	**Дети с высоким содержанием $CD3^+/TLR3^+$** Children with high $CD3^+/TLR3^+$ level **(n = 3)**	**Дети с низким содержанием $CD3^+/TLR7^+$** Children with low $CD3^+/TLR7^+$ level **(n = 15)**	**Дети с высоким содержанием $CD3^+/TLR7^+$** Children with high $CD3^+/TLR7^+$ level **(n = 5)**
Жидкий стул после выписки Loose stools after discharge	52,9 (40,4–65,4)	66,7 (33,4–100,0)	53,3 (40,0–66,6)	60,0 (35,5–84,5)
Патологические примеси в стуле после выписки Pathological impurities in the stool after discharge	29,4 (18,0–40,8)	33,3 (6,1–60,5)	20,0 (9,3–30,7)	40,0 (15,5–64,5)
Эпизоды ОРИ (всего) Episodes of ARI (total)	41,2 (28,9–53,5)	33,3 (6,1–60,5)	40,0 (26,9–53,1)	40,0 (15,5–64,5)
Эпизоды ОРИ (повторные) Episodes of ARI (repeated)	17,6 (8,1–27,1)*	0,0	20,0 (9,3–30,7)#	0,0
Эпизоды аллергических заболеваний Episodes of allergic diseases	11,8 (3,7–19,9)*	0,0	13,3 (4,2–22,4)#	0,0
Патология со стороны ЖКТ Pathology from the GIT	23,5 (12,9–34,1)*	0,0	20,0 (9,3–30,7)	20,0 (2,1–37,9)

Примечание. * — $p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни между группами детей с низким и высоким содержанием $CD3^+/TLR3^+$; # — $p < 0,05$ по χ^2 критерию Пирсона и критерию Манна–Уитни между группами детей с низким и высоким содержанием $CD3^+/TLR7^+$.
Note. * — $p < 0.05$ according to the χ^2 Pearson criterion and Mann–Whitney criterion between groups of children with low and high $CD3^+/TLR3^+$ count; # — $p < 0.05$ according to the χ^2 Pearson criterion and Mann–Whitney criterion between groups of children with low and high $CD3^+/TLR7^+$ count.

Несомненно, что важную роль в течении и исходах ротавирусной инфекции играет возрастной фактор, как это было отмечено для детей раннего возраста J. Pott и соавт., подчеркивавшими более низкий уровень у них экспрессии TLR3 по сравнению со взрослыми [7]. «Порочный круг» замыкается в результате того, что низкая экспрессия TLR3 способствует восприимчивости к ротавирусной инфекции [3].

Заключение

Исходя из полученных в проведенном исследовании данных, можно считать исходно низкое количество иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих TLR3 и TLR7, предикторами неблагоприятного течения и исходов ротавирусной инфекции у детей раннего возраста, что необходимо учитывать при определении тактики лечения данного заболевания в этой группе пациентов и при наличии показаний дополнять терапию не только препаратами интерферона, но и антибактериальными средствами.

Конфликт интересов

Исследование выполнено при финансовой поддержке ООО «Ферон», которому была предоставлена возможность ознакомиться с предварительной версией этой публикации на предмет фактической точности, но авторы несут полную ответственность за окончательное содержание и интерпретацию.

Список литературы/References

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 340 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2021: State Report. *Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, 2022. 340 p. (In Russ.)*]
2. Amimo J.O., Raev S.A., Chepngeno J., Mainga A.O., Guo Y., Saif L., Vlasova A.N. Rotavirus interactions with host intestinal epithelial cells. *Front. Immunol., 2021, no. 12: 793841. doi: 10.3389/fimmu.2021.793841*
3. Günaydın G., Nordgren J., Svensson L., Hammarström L. Mutations in toll-like receptor 3 are associated with elevated levels of rotavirus-specific IgG antibodies in IgA-deficient but not IgA-sufficient individuals. *Clin. Vaccine Immunol., 2014, vol. 21, no. 3, pp. 298–301. doi: 10.1128/CVI.00666-13*
4. Miya T.V., Groome M.J., de Assis Rosa D. TLR genetic variation is associated with rotavirus-specific IgA seroconversion in South African black infants after two doses of Rotarix vaccine. *Vaccine, 2021, vol. 39, no. 48, pp. 7028–7035. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.10.051*
5. Oh H.-M., Lee S.W., Park M.H., Kim M.H., Ryu Y.B., Kim M.S., Kim H.-H., Park K.H., Lee W.S., Park S.-J., Rho M.-C. Norkurarinol inhibits toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated pro-inflammatory signaling pathway and rotavirus replication. *J. Pharmacol. Sci., 2012, vol. 118, no. 2, pp. 161–170. doi: 10.1254/jphs.11077fp*
6. Patel M.C., Shirey K.A., Pletneva L.M., Boukhvalova M.S., Garzino-Demo A., Vogel S.N., Blanco J.C. Novel drugs targeting toll-like receptors for antiviral therapy. *Future Virology, 2014, vol. 9, no. 9, pp. 811–829. doi: 10.2217/fvl.14.70*
7. Pott J., Stockinger S., Torow N., Smoczek A., Lindner C., McInerney G., Bäckhed F., Baumann U., Pabst O., Bleich A., Hornef M.W. Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. *PLoS Pathog., 2012, vol. 8, no. 5: e1002670. doi: 10.1371/journal.ppat.1002670*
8. Sen A., Ding S., Greenberg H.B. The role of innate immunity in regulating rotavirus replication, pathogenesis, and host range restriction and the implications for live rotaviral vaccine development. *Mucosal Vaccines, 2020, no. 40, pp. 683–697. doi: 10.1016/b978-0-12-811924-2.00041.9*

Авторы:

Горбунов С.Г., д.м.н., профессор кафедры детских инфекционных болезней ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия;

Мазанкова Л.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия;

Оськин А.Н., аспирант кафедры детских инфекционных болезней ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Gorbunov S.G., DSc (Medicine), Professor of the Department of Children's Infectious Diseases, Russian Medical Academy of Continuig Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Mazankova L.N., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Children's Infectious Diseases, Russian Medical Academy of Continuig Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Os'kin A.N., PhD Student, Department of Children's Infectious Diseases, Russian Medical Academy of Continuig Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.09.2022
Принята к печати 21.06.2023

Received 30.09.2022
Accepted 21.06.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 586–590

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 586–590

РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19

З.Г. Каликян

Ереванский Государственный Медицинский Университет им. Мхитара Гераци, Ереван, Армения

Резюме. В течение пандемии COVID-19 появились публикации о различных кожных проявлениях, которые в основном вызваны самим коронавирусом, однако есть данные и о случаях нежелательных реакций на лекарства. В Армении врачами профилированных клиник периодически велись консультации с аллергологами-иммунологами по поводу аллергических состояний, которые у многих пациентов уже имелись на момент госпитализации, или проявились после нее. В данной серии мы представляем 3 наиболее интересных случая лекарственно-индуцированных реакций с различными кожными проявлениями у пациентов с COVID-19-пневмонией, по поводу которой назначаются антибиотики. Оценка причинной значимости антибиотиков проводилась нами с применением подходов алгоритма Нараньо. В первом случае (пациентка женского пола, 58 лет), на основании клинической картины поставлен диагноз макуло-папуллезной экзантемы. Несмотря на то что сам коронавирус также может вызвать подобные проявления, анамнестически выявленная в прошлом аллергическая реакция на ампициллин позволила предположить, что цефтриаксон — наиболее вероятная причина (так как оба препарата являются бета-лактамными антибиотиками). Второй случай (пациент мужского пола, 53 года), клинически проявлявшийся как васкулит, вызвал некоторые затруднения, так как довольно часто является одним из кожных проявлений COVID-19 и редко индуцируется лекарствами. Учитывая отмечавшуюся реакцию на бета-лактамный антибиотик в анамнезе, а также то, что пациент принимал амоксициллин без назначения врача до госпитализации, и при поступлении в клинику у него уже наблюдалось поражение кожи, причинно-значимая роль амоксициллина нами была оценена как возможная. В третьем случае (пациентка женского пола, 64 года), диагностированном как буллезное лекарственное поражение кожи, несмотря на единичные случаи описания таких поражений в качестве проявлений самого коронавируса, наиболее вероятным причинно-значимым фактором был мокситек — антибиотик фторхинолонового ряда — особенно с учетом выявленного в анамнезе герпеса. Согласно действующим рекомендациям во всех трех случаях с больными обсуждался вопрос проведения проб для подтверждения причинной значимости указанных лекарств и/или подбора альтернативных препаратов при необходимости. В связи с этим пациенты с их согласия включены в базу данных пациентов с тяжелыми реакциями лекарственной гиперчувствительности.

Ключевые слова: *COVID-19, клинический случай, реакции лекарственной гиперчувствительности, антибиотики, макуло-папуллезная экзантема, васкулит, буллезный лекарственный дерматит.*

Адрес для переписки:
Каликян Заруи Геворковна
0025, Армения, Ереван, ул. Корюна, 2,
Ереванский Государственный Медицинский Университет
им. Мхитара Гераци.
Тел.: +374 93 11-88-45.
E-mail: zkalikyan@yandex.ru

Contacts:
Zaruhi G. Kalikyan
0025, Armenia, Yerevan, Koryun str., 2,
Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi.
Phone: +374 93 11-88-45.
E-mail: zkalikyan@yandex.ru

Для цитирования:
Каликян З.Г. Реакции гиперчувствительности к антибиотикам в период пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 586–590. doi: 10.15789/2220-7619-AHR-8062

Citation:
Kalikyan Z.G. Antibiotics hypersensitivity reactions during COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 586–590. doi: 10.15789/2220-7619-AHR-8062

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AHR-8062

ANTIBIOTICS HYPERSENSITIVITY REACTIONS DURING COVID-19 PANDEMIC

Kalikyan Z.G.

Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi, Yerevan, Armenia

Abstract. During the COVID-19 pandemic, there have emerged publications about various skin manifestations mainly caused by the related coronavirus, also including some case reports on dermal drug-related adverse reactions. In Armenia, the doctors in COVID-19 hospitals periodically consulted with allergists-immunologists regarding allergic conditions that many patients already suffered on admission or manifested after it. We present the series of three most interesting drug-induced cases with various skin manifestations in patients with COVID-19 pneumonia who requited antibiotic therapy. The causative significance of antibiotics was assessed according to Naranjo's algorithm. In the first case (a 58-year-old female patient), a diagnosis of maculopapular exanthem was made based on the clinical picture. Although the coronavirus per se can result in similar manifestations, previous history of allergic reaction to ampicillin led to the conclusion that ceftriaxone (both are beta-lactam antibiotics) was the most probable cause. The second case (a 53-year-old male patient), clinically manifested as vasculitis, caused some difficulties because this is quite often skin manifestations related to SARS-CoV-2, and is rarely induced by medications. Taking into account the history of reaction to beta-lactam antibiotic, as well as the fact that the patient took amoxicillin without a prescription before hospitalization and with overt skin lesions at that time, amoxicillin was assessed as a possible cause. In the third case (a 64-years-old female patient), diagnosed with a bullous drug-induced skin eruption, despite isolated cases of such lesions can be manifestations of SARS-CoV-2 infection, moxitec (fluoroquinolone antibiotic) was assessed as the most probable cause, especially taking into account herpes in history. According to current recommendations, an issue of drug tests was discussed with all three patients to confirm the causative significance of indicated drugs and/or to select an alternative drug, if necessary. In this regard, the subjects were included in the database of patients with severe drug hypersensitivity reactions by their informed consent.

Key words: *COVID-19, case report, drug hypersensitivity reactions, antibiotics, maculopapular exanthem, vasculitis, bullous drug eruption.*

Введение

В течение пандемии коронавируса накоплены данные о различных кожных проявлениях, которые подобны таковым при других вирусных инфекциях или связаны с сосудистой патологией [1, 10]. Согласно данным большинства исследователей кожные симптомы в основном являются проявлениями самого коронавируса, однако есть публикации о зарегистрированных среди пациентов с COVID-19 случаях нежелательных реакций на лекарства, в которых эти реакции оцениваются как вероятные и возможные [4, 13]. В доступном нам систематическом обзоре приведены данные о реакциях гиперчувствительности к антивирусным, иммуномодуляторным, антивоспалительным и антикоагулянтным препаратам, наиболее часто применяющимся в лечении пациентов с COVID-19 [3]. Впоследствии появились также сообщения о тяжелых случаях гиперчувствительности с вакцинам [7]. Поскольку у пациентов с COVID-19 вторичные бактериальные пневмонии являются достаточно частым осложнением, при котором необходимо назначение антибиотиков, в доступной нам литературе также есть данные о распространенности реакций гиперчувствительности к антибиотикам при COVID-19 [2, 3, 9]. Другим важным аспектом является лечение пациентов с тяжелыми реакциями гиперчувствительности на фоне COVID-19. До пандемии при таких реакциях назначалась терапия системными стероидами, но применение стероидов при COVID-19 в начале пандемии вызывало разногласия в связи с отмечающимися побочными эффектами; в дальнейшем подходы к их назначению были значительно пересмотрены [12]. В Армении в течение пандемии врачами профилированных для лечения COVID-19 больниц в соответствии с рекомендациями [8] периодически велись консультации со специалистами аллергологами-иммунологами по поводу аллергических состояний, которые у многих пациентов уже имелись на момент госпитализации, или проявились после нее. В данной статье мы представляем 3 наиболее интересных случая лекарственно-индуцированных реакций с различными кожными проявлениями у пациентов с COVID-19-пневмонией в соответствии с требованиями по оформлению клинических случаев CARE.

Клинический случай 1

Пациентка женского пола, 58 лет, госпитализирована с жалобами на затрудненное дыхание, одышку, сухой кашель, небольшой насморк, общую слабость. В анамнезе гипертензия, принимает Эналаприл (Enalapril), 10 мг/сут. При осмотре — тахикардия (110 уд./мин), температура тела — 38,6°C, сатурация крови (SpO_2) — 89%. Сразу после поступления начата оксигенотерапия (7 л/мин), инфузионная терапия. Заключение КТ грудной клетки: множественные двусторонние долевые и субсегментарные участки матового затемнения. ПЦР назофарингеального мазка — положительная

на SARS-CoV-2. Общий анализ крови: число лейкоцитов — 9,1 × 10^9/л, тромбоцитов — 385 × 10^9/л, эозинофилов — 5%, лимфоцитов — 39%, остальные показатели в норме. Поставлен диагноз: «COVID-19, двусторонняя полисегментарная интерстициальная пневмония тяжелой степени». Назначено: Парацетамол (Paracetamolum), 500 мг, перорально (при необходимости), Плаквенил (Hydroxychloroquine), 400 мг/сут, перорально, Цефтриаксон (Ceftriaxone), 1 г/сут, в/в, Фраксипарин (Nadroparin calcium), 0,3 мл, п/к. На 11-й день на фоне общего улучшения состояния — уменьшение одышки, кашля, нормальной температуры тела и показателей ОАК (все в норме, кроме тромбоцитов, число которых увеличилось до 415 × 10^9/л) — появились жалобы на сильный зуд, чувство жжения, сыпь в области шеи. В течение дня сыпь распространилась на области грудной клетки и спины, по поводу чего была проведена консультация с аллергологом-иммунологом. При сборе аллергологического анамнеза выяснилось, что в прошлом более 10 лет назад у пациентки была аллергическая реакция на ампициллин, о которой она не помнила на момент госпитализации. При осмотре — на фоне гиперемии распространенная макуло-папуллезная сыпь в области шеи, груди и спины. Нами диагностирована лекарственно-индуцированная генерализованная макуло-папуллезная экзантема. Прием цефтриаксона прекращен, однако фраксипарин и плаквенил было решено продолжать. Назначена инфузионная терапия с антигистаминным препаратом I поколения Тавегилом (Clemastine), 2 мг/сут и антигистаминный препарат II поколения Парлазин (Cetirizine), 10 мг/сут, перорально. Состояние пациентки на следующий день оставалось без изменений и причиняло ей достаточно сильный дискомфорт, поэтому встал вопрос о назначении системного стероида, который, после обсуждения с лечащим врачом, было решено все-таки не применять. Была увеличена доза антигистаминных препаратов вдвое и, в результате, уже через 2 дня наметилась положительная динамика: значительно уменьшились зуд и гиперемия, а через 6 дней состояние кожи полностью нормализовалось. В течение последующих 5 дней ухудшения или появления новых элементов не наблюдалось. При выписке из больницы пациентке даны рекомендации относительно соблюдения мер предосторожности в отношении антибиотиков, и в частности бета-лактамов, обсужден вопрос о возможности проведения проб.

Клинический случай 2

Пациент мужского пола, 53 года, госпитализирован в связи с 10-дневным непродуктивным кашлем и периодической лихорадкой. В анамнезе: 3 года назад была отмечена кожная реакция на антибиотик (цефаклор). За 3 дня до госпитализации без назначения врача принимал Парацетамол (Paracetamolum), 500 мг/сут, Витамин С (Vitamin C), 1000 мг/сут, Амоксициллин (Amoxicillin), 500 мг/сут. При осмотре: сыпь в виде пурпурных, зудящих пятен на нижних конечностях, эритема, которые появились за день до госпитализации, тахикардия (120 уд./мин), температура тела — 39,3°С, сатурация кислородом (SpO_2) — 87%. Сразу после поступления все препараты, которые пациент принимал ранее, были отменены, начата оксигенотерапия (8 л/мин). Заключение КТ грудной клетки — уплотнение легочной паренхимы в нижних долях обоих легких и в средней части правого легочного поля. ПЦР назофарингеального мазка — положительная на SARS-CoV-2. Общий анализ крови: нейтрофильный лейкоцитоз — 9,5 × 10^9/л, тромбоцитоз (337 × 10^9/л), СОЭ — 25 мм рт.ст., остальные показатели в норме; СРБ — 7,1 мг/л; коагулограмма: протромбиновое время и частичное тромбопластиновое время — в норме. Анализы крови на ВИЧ, антинуклеарные антитела и антинейтрофильные цитоплазматические антитела — отрицательные. Поставлен диагноз: «COVID-19, двусторонняя полисегментарная интерстициальная пневмония тяжелой степени». После консультации с аллергологом-иммунологом сделано предположение о лекарственно-индуцированном васкулите. Назначено: Фраксипарин (Nadroparin calcium), 0.3 мл, п/к, Диклофенак (Diclofenac), 75 мг/сут, в/м, Дексаметазон (Dexamethasone), 20 мг/сут, в/в. Поскольку в анамнезе имела место аллергическая реакция на антибиотики бета-лактамного ряда, было решено назначить антибиотик из группы макролидов — Азитромицин (Azithromycin), 500 мг/сут, перорально. Наружно наносился крем Мометазон фуроат (Mometasone furoate). В течение последующих дней наблюдалось исчезновение лихорадки, улучшение респираторных и кожных симптомов. Оксигенотерапия прекращена через 14 дней. В результатах лабораторных исследований отмечена нормализация всех показателей, снижение концентрации СРБ до 5,3 мг/л. На коже отмечалась незначительная гиперпигментация. После двух отрицательных результатов ПЦР-тестов на SARS-CoV-2, пациент выписан домой. Рекомендовано избегать применения бета-лактамных антибиотиков, не заниматься самолечением, а в дальнейшем, при необходимости, обсудить с врачом-аллергологом вопрос проведения проб.

Клинический случай 3

Пациентка женского пола, 64 года, госпитализирована с жалобами на лихорадку до 38,5°С, сухой, мучительный кашель и периодическую

слабо выраженную одышку. В анамнезе — сахарный диабет 2-го типа, по поводу которого принимает Метформин (Metformin), 500 мг/сут, а также тиреоидит — принимает Эутирокс (Levothyroxine sodium), 50 мкг/сут. При осмотре — температура тела 37,5°C, сатурация крови (SpO_2) — 92%. После поступления начата оксигенотерапия (7 л/мин). Заключение КТ грудной клетки: множественные двусторонние уплотнения легочной паренхимы. ПЦР назофарингеального мазка — положительная на SARS-CoV-2. Общий анализ крови: число лейкоцитов — 9,2 × 10^9/л, лимфоциты — 37%, остальные показатели в норме. Поставлен диагноз: «COVID-19, двусторонняя интерстициальная пневмония тяжелой степени». Назначено: Анальгин (Metamizole sodium), 500 мг, в/м (при необходимости), Омепразол (Omeprazole), 40 мг/сут, перорально, Мокситек (Moxifloxacinum), 400 мг/сут, в/в, Клексан (Enoxaparin sodium), 40 мг/сут, п/к, Дексаметазон (Dexamethasone), 20 мг/сут, в/в. Через 9 дней, несмотря на стихание респираторных симптомов и нормализацию анализов, появились жалобы на жжение и дискомфорт в области ягодицы и спины, при осмотре которых обнаружились 2 буллы размерами около 4–5 см в диаметре, заполненные серозной жидкостью. Была проведена консультация аллерголога-иммунолога, в анамнезе был установлен эпизод Herpes zoster 7 лет назад, поставлен диагноз буллезного лекарственного поражения кожи. Все принимаемые лекарства, кроме дексаметазона, были отменены, буллы обработаны Бетадином (Povidone-iodine) и наложена легкая раневая повязка. К сожалению, в связи с локализацией, на следующее утро буллы вскрылись, образовались болезненные эрозии. Местное лечение было продолжено, в течение последующих 5 дней эрозивные поверхности очистились, и появились признаки реэпителизации. Пациентка выписана на 18-й день, на месте кожных поражений осталась гиперпигментация. Рекомендовано избегать антибиотиков, при необходимости обсудить с врачом-аллергологом возможность проведения проб с целью определения альтернативного антибактериального препарата для применения в случае необходимости.

Обсуждение

В представленных случаях имеет место диагноз интерстициальной пневмонии, являющейся осложнением коронавирусной инфекции, по поводу которой назначаются антибиотики. Оценка причинной значимости принятых пациентами антибиотиков для развития различных кожных проявлений нами проводилась с применением подходов алгоритма Нараньо [14].

В первом случае на основании клинической картины поставлен диагноз макуло-папуллезной экзантемы. Такие высыпания достаточно часто бывают следствием лекарственной гиперчувствительности [4], хотя сам коронавирус также может вызвать подобные проявления. Несмотря на то что пациентка помимо прочих препаратов, получала плаквенил, часто вызывающий нежелательные реакции [11], анамнестически выявленная в прошлом аллергическая реакция на ампициллин позволила предположить, что цефтриаксон — наиболее вероятная причина развития лекарственно-индуцированной макуло-папуллезной экзантемы, так как оба препарата являются бета-лактамными антибиотиками. Примечательно, что в терапии не применялись системные стероиды, в тот период пандемии считавшиеся нецелесообразными [1, 12], однако состояние пациентки удалось купировать.

Второй случай, клинически проявлявшийся как васкулит, вызвал некоторые затруднения с установлением причинно-значимого фактора, поскольку данное состояние довольно часто является одним из кожных проявлений COVID-19 и редко индуцируется лекарствами, в отличие от предыдущего случая [6, 13]. Важным моментом было то, что в анамнезе отмечалась реакция на бета-лактамный антибиотик, а также то, что пациент принимал амоксициллин без назначения врача до госпитализации, и при поступлении в клинику у него уже наблюдалось поражение кожи. Примечательно, что после необходимого назначения антибиотика другой группы, в частности азитромицина, который в литературе отмечается в качестве наиболее часто вызывающего реакции антибиотика при COVID-19, кожные проявления разрешились на фоне терапии стероидами [3, 4]. Таким образом, причинно-значимая роль амоксициллина нами была оценена как возможная, с учетом и того обстоятельства, что до госпитализации пациент принимал и другие препараты.

И, наконец, в третьем случае, диагностированном как буллезное лекарственное поражение кожи, наиболее вероятным причинно-значимым фактором был мокситек — антибиотик фторхинолонового ряда, так как остальные препараты крайне редко вызывают подобные реакции [3]. С другой стороны, несмотря на единичные случаи описания буллезных поражений в качестве проявлений самой коронавирусной инфекции [11], данное состояние наиболее типично для лекарственно-индуцированных поражений кожи, особенно с учетом выявленного в анамнезе герпеса [5].

Согласно рекомендациям по ведению пациентов с лекарственной гиперчувствительностью во всех трех случаях с пациентами обсуж-

дался вопрос проведения аллергических проб для подтверждения причинной значимости указанных лекарств и/или подбора, при необходимости, альтернативных антибактериальных препаратов [4, 8]. В связи с этим пациенты с их информированного согласия были включены в базу данных пациентов с тяжелыми реакциями лекарственной гиперчувствительности.

Список литературы/References

1. Atzori L., Perla S., Atzori M.G., Ferreli C., Rongioletti F. Cutaneous drug eruptions associated with COVID-19 therapy. *JAAD Int., 2020, vol. 1, no. 1, pp. 73–76. doi: 10.1016/j.jdin.2020.05.004*
2. Cucka B., Biglione B., Zhou L., Phillips E.J., Bassir F., Samarakoon U., Rrapi R., Chand S., Wang L., Alvarez-Arango S., Blumenthal K.G., Kroshinsky D. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms in patients hospitalized with COVID-19: a case series from a large US healthcare system. *Br. J. Dermatol., 2022, vol. 187, no. 4, pp. 619–622. doi: 10.1111/bjd.21706*
3. Dordal Culla M.T., Herrera-Lasso Regás V., Martí-Garrido J., Rodríguez Cumplido D., Vázquez-Revuelta P., Lleonart Bellfill R. Treating COVID-19: review of drug hypersensitivity reactions. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 2020, vol. 30, no. 6, pp. 385–399. doi: 10.18176/jiaci.0588*
4. Gelincik A., Brockow K., Çelik G.E., Doña I., Mayorga C., Romano A., Soyer Ö., Atanaskovic-Markovic M., Barbaud A., Torres M.J. Diagnosis and management of the drug hypersensitivity reactions in Coronavirus disease 19: an EAACI Position Paper. *Allergy, 2020, vol. 75, no. 11, pp. 2775–2793. doi: 10.1111/all.14439*
5. Manjaly Thomas Z.R., Leuppi-Taegtmeyer A., Jamiolkowski D., Steveling-Klein E., Bellutti-Enders F., Scherer Hofmeier K., Hartmann K. Emerging treatments in COVID-19: adverse drug reactions including drug hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol., 2020, vol. 146, no. 4, pp. 786–789. doi: 10.1016/j.jaci.2020.07.008*
6. Mayor-Ibarguren A., Feito-Rodriguez M., Quintana Castanedo L., Ruiz-Bravo E., Montero Vega D and Herranz-Pinto P. Cutaneous small vessel vasculitis secondary to COVID-19 infection: a case report. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 2020, vol. 34, pp. e541–e542. doi: 10.1111/jdv.16670*
7. McMahon D.E., Amerson E., Rosenbach M., Lipoff J.B., Moustafa D., Tyagi A., Desai S.R., French L.E., Lim H.W., Thiers B.H., Hruza G.J., Blumenthal K.G., Fox L.P., Freeman E.E. Cutaneous reactions reported after Moderna and Pfizer COVID-19 vaccination: a registry-based study of 414 cases. *J. Am. Acad. Dermatol., 2021, vol. 85, no. 1, pp. 46–55. doi: 10.1016/j.jaad.2021.03.092*
8. Pfaar O., Klimek L., Jutel M., Akdis C.A., Bousquet J., Breiteneder H., Chinthrajah S., Diamant Z., Eiwegger T., Fokkens W.J., Fritsch H.W., Nadeau K.C., O'Hehir R.E., O'Mahony L., Rief W., Sampath V., Schedlowski M., Torres M.J., Traidl-Hoffmann C., Wang Y., Zhang L., Bonini M., Brehler R., Brough H.A., Chivato T., Del Giacco S.R., Dramburg S., Gawlik R., Gelincik A., Hoffmann-Sommergruber K., Hox V., Knol E.F., Lauerma A., Matricardi P.M., Mortz C.G., Ollert M., Palomares O., Riggioni C., Schwarze J., Skypala I., Untersmayr E., Walusiak-Skorupa J., Ansotegui I.J., Bachert C., Bedbrook A., Bosnic-Anticevich S., Brussino L., Canonica G.W., Cardona V., Carreiro-Martins P., Cruz A.A., Czarlewski W., Fonseca J.A., Gotua M., Haahtela T., Ivancevich J.C., Kuna P., Kvedariene V., Larenas-Linnemann D.E., Abdul Latiff A.H., Mäkelä M., Morais-Almeida M., Mullol J., Naclerio R., Ohta K., Okamoto Y., Onorato G.L., Papadopoulos N.G., Patella V., Regateiro F.S., Samoliński B., Suppli Ulrik C., Toppila-Salmi S., Valiulis A., Ventura M.T., Yorgancioglu A., Zuberbier T., Agache I. COVID-19 pandemic: practical considerations on the organization of an allergy clinic — an EAACI/ARIA position paper. *Allergy, 2021, vol. 76, no. 3, pp. 648–676. doi: 10.1111/all.14453*
9. Ramírez E., Urroz M., Rodríguez A., González-Muñoz M., Martín-Vega A., Villán Y., Seco E., Monserrat J., Frías J., Carcas A.J., Borobia A.M. Incidence of suspected serious adverse drug reactions in corona virus disease-19 patients detected by a pharmacovigilance program by laboratory signals in a tertiary hospital in Spain: cautionary data. *Front. Pharmacol., 2020, vol. 11: 602841. doi: 10.3389/fphar.2020.602841*
10. Ridolo E., Pucciarini F., Barone A., Nouvenne A., Meschi T., Peveri S., Incorvaia C. Dermatological manifestations during COVID-19 infection: a case series and discussion on the problem of differential diagnosis. *Acta Biomed., 2021, vol. 92, no. 1: e2021103. doi: 10.23750/abm.v92i1.11236*
11. Rossi C.M., Beretta F.N., Traverso G., Mancarella S., Zenoni D. A case report of toxic epidermal necrolysis (TEN) in a patient with COVID-19 treated with hydroxychloroquine: are these two partners in crime? *Clin. Mol. Allergy, 2020, vol. 18: 19. doi: 10.1186/s12948-020-00133-6*
12. Russell C.D., Millar J.E., Baillie J.K. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 473–475. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30317-2*
13. Sakaida T., Tanimoto I., Matsubara A., Nakamura M., Morita A. Unique skin manifestations of COVID-19: Is drug eruption specific to COVID-19? *J. Dermatol. Sci., 2020, vol. 99, no. 1, pp. 62–64. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.05.002*
14. Shukla A.K., Jhaj R., Misra S., Ahmed S.N., Nanda M., Chaudhary D. Agreement between WHO-UMC causality scale and the Naranjo algorithm for causality assessment of adverse drug reactions. *J. Family Med. Prim. Care, 2021, vol. 10, no. 9, pp. 3303–3308. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_831_21*

Автор:

Каликян З.Г., к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии Ереванского Государственного Медицинского Университета им. Мхитара Гераци, Ереван, Армения.

Author:

Kalikyan Z.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergy, Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi, Yerevan, Armenia.

Поступила в редакцию 30.03.2023
Принята к печати 02.05.2023

Received 30.03.2023
Accepted 02.05.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 3, pp. 591–596

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 3, с. 591–596

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* bv. *TRYPTOPHANDESTRUENS* И ЕГО СУББИОВАРОВ А И В

Е.П. Сиволодский[1,2], Л.А. Краева[1,2], Е.В. Мельникова[1], Г.В. Горелова[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 — повысить диагностическую чувствительность идентификации бактерий *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* и определить распространенность этого биовара и его суббиоваров среди клинических изолятов *A. baumannii*. Объектом исследования были 210 первичных штаммов *A. baumannii*, выделенных в 2021–2022 гг. в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, из них 42 — штаммы *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*. Бактерии биовара *tryptophandestruens* идентифицировали по хромогенной биотрансформации бензоата натрия на плотной питательной среде (г/л): пептон ферментативный 5,0; NaCl 5,0; $FeCl_3$ $6H_2O$ (10% водный раствор) 0,1–1 мл; бромтимоловый синий (1,6% водный раствор) 3 мл; агар 15,0; NaOH (4% раствор) 2,6–3 мл; вода дистиллированная 1 л; все компоненты растворяли при нагревании, затем добавляли бензоат натрия (CAS 532-32-1) 1,0–2,0; корректировали pH 7,2±0,2; стерилизовали при 121°C, разливали в чашки. Бактерии суббиоваров А и В биовара *tryptophandestruens* идентифицировали по хромогенной биотрасформации L-триптофана, используя эту же питательную среду с L-триптофаном (1,0–2,0 г/л) вместо бензоата натрия. Обе питательные среды применяли одновременно. Исследуемые культуры *A. baumannii* засевали петлей на среды в виде бляшки, инкубировали аэробно при 37°C 18–24 ч, затем учитывали результат: наличие темно-коричневой зоны окраски питательной среды вокруг газона бактерий на среде с бензоатом натрия и на среде с L-триптофаном указывало на их принадлежность к суббиовару А биовара *tryptophandestruens*; при наличии зоны темно-коричневой окраски питательной среды вокруг газона бактерий на среде с бензоатом натрия и отсутствии зоны окраски на среде с L-триптофаном идентифицировали биовар *tryptophandestruens* суббиовар В. В результате исследования впервые выявлена хромогенная биотрансформация бензоата натрия (бензойной кислоты) и ее значение как маркера биовара *tryptophandestruens A. baumannii*. Обнаружены два суббиовара А и В биовара *tryptophandestruens*. Разработан метод идентификации биовара *tryptophandestruens A. baumannii* и его суббиоваров А и В по хромогенной биотрасформации бензоата натрия и L-триптофана, что повышает диагностическую чувствительность метода за счет выявления суббиовара В. Установлена частота распространения бактерий биовара *tryptophandestruens* среди первичных клинических изолятов *A. baumannii* в 2021–2022 гг.: из 210 штаммов *A. baumannii* — 42 (20,0±3,5%) — штаммы bv. *tryptophandestruens*, в том числе суббиовар А — 27 (12,9±2,3%), суббиовар В — 15 (7,1±1,7%).

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii, биовар tryptophandestruens, суббиовары А и В, хромогенная биотрансформация, бензоат натрия, L-триптофан, идентификация.*

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., Горелова Г.В. Метод идентификации Acinetobacter baumannii bv. tryptophandestruens и его суббиоваров А и В // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 3. С. 591–596. doi: 10.15789/2220-7619-MFI-9379

Citation:
Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Melnicova E.V., Gorelova G.V. Method for identification of Acinetobacter baumannii bv. tryptophandestruens and its subbiovars A and B // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 591–596. doi: 10.15789/2220-7619-MFI-9379

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MFI-9379

METHOD FOR IDENTIFICATION OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* bv. *TRYPTOPHANDESTRUENS* AND ITS SUBBIOVARS A AND B

Sivolodskii E.P.[a,b], Kraeva L.A.[a,b], Melnicova E.V.[a], Gorelova G.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 was to increase diagnostic sensitivity for identification of *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* bacteria and assess prevalence of this biovar and its subbiovars among *A. baumannii* clinical isolates. There were examined 210 primary strains of *A. baumannii* isolated in 2021–2022 at Bacteriological Laboratory of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov, of which 42 strains were *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*. *Tryptophandestruens* biovar bacteria were identified by chromogenic biotransformation of sodium benzoate on a dense nutrient medium (g/l): peptone enzymatic 5.0; NaCl 5.0; $FeCl_3$ $6H_2O$ (10% aqueous solution) 0.1–1 ml; bromothymol blue (1.6% aqueous solution) 3 ml; agar 15.0; NaOH (4% solution) 2.6–3 ml; distilled water 1 l; all components were dissolved by heating and added with sodium benzoate (CAS 532-32-1) 1.0–2.0; adjusted pH 7.2±0.2; sterilized at 121°C, poured into Petri dishes. Bacteria of subbiovars A and B of biovar *tryptophandestruens* were identified by chromogenic biotransformation of L-tryptophan using the same nutrient medium supplemented with L-tryptophan (1.0–2.0 g/l) instead of sodium benzoate. Both nutrient media were used simultaneously. The *A. baumannii* cultures studied were seeded with a loop on the media sectors in the form of a plaque, incubated aerobically at 37°C for 18–24 hours, and analyzed final data as follows: the presence of a dark brown color zone of the nutrient medium around bacterial lawn on sodium benzoate- and L-tryptophan-containing medium indicated detection of subbiovar A of the *tryptophandestruens* biovar; in case of dark brown zone on sodium benzoate- but not L-tryptophan-containing medium around bacterial lawn identified biovar *tryptophandestruens* subbiovar B. The study revealed for the first time the chromogenic biotransformation of sodium benzoate (benzoic acid) and its importance as a marker for the biovar *tryptophandestruens A. baumannii*. Two subbiovars A and B of the *tryptophandestruens* biovar were found. A method was developed to identify the biovar *tryptophandestruens* A. baumannii and its subbiovars A and B by chromogenic biotransformation of sodium benzoate and L-tryptophan, which enhances diagnostic sensitivity by detecting the subbiovar B. The frequency of *tryptophandestruens* biovar distribution among primary clinical isolates of *A. baumannii* in 2021–2022 was determined: out of 210 strains of *A. baumannii* were 42 (20.0±3.5%) strains of bv. *tryptophandestruens* including subbiovar A — 27 (12.9±2.3%), subbiovar B — 15 (7.1±1.7%).

Key words: *Acinetobacter baumannii, biovar tryptophandestruens, subbiovars A and B, chromogenic biotransformation, sodium benzoate, L-tryptophan, identification.*

Введение

В 2021 г. было опубликовано описание бактерий биовара *tryptophandestruens A. baumannii*, осуществляющего хромогенную биотрансформацию L-триптофана [1]. Авторы предложили проводить идентификацию бактерий этого биовара тестами на хромогенную биотрансформацию L-триптофана и отсутствие утилизации гиппурата натрия, что доступно лабораториям любого уровня. Тест на хромогенную биотрансформацию антраниловой кислоты использовать не предлагали, ввиду ограничения доступа лабораторий к этому веществу как прекурсору наркотических средств. Дальнейшие наши исследования показали значительное распространение бактерий биовара *tryptophandestruens* среди клинических изолятов *A. baumannii*, однако обнаружили единичные штаммы этого биовара отрицательные по хромогенной биотрансформации L-триптофана, что снижало диагностическую чувствительность идентификации.

Цель данного исследования — повысить диагностическую чувствительность метода идентификации бактерий *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* и определить распространенность этого биовара и его суббиоваров среди клинических изолятов *A. baumannii*.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Объектами исследования были 210 первичных штаммов *A. baumannii*, выделенных в 2021 и 2022 гг. в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Из них 42 первичных штамма были иддентифицированы на кафедре микробиологии академии как *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*. В сравнительных исследованиях использовали штаммы других видов *Acinetobacter: A. nosocomialis* (n = 8), *A. pittii* (n = 8), *A. calcoaceticus* (n = 1), а также 34 видов других 22 родов *(Pseudomonas, Moraxella, Burkholderia, Stenotrophomonas, Alcaligenes, Shewanella, Salmonella, Klebsiella, Serratia, Hafnia, Enterobacter, Citrobacter, Proteus, Morganella, Providentia, Escherichia, Shigella, Yersinia, Vibrio, Staphylococcus, Enterococcus, Bacillus).* Видовая принадлежность всех штаммов была подтверждена методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной ионизацией (MALDI-ToF MS) в Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова и НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Все штаммы *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* 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)

Питательная среда для идентификации бактерий биовара A. baumannii bv. tryptophandestruens по хромогенной биотрансформации бензоата натрия и методика ее применения. Состав и приготовление питательной среды. В 1 л дистиллированной воды вносят: пептон ферментативный 5,0 г; NaCl 5,0 г; $FeCl_3$ $6H_2O$ (10% водный раствор) 0,1–1,0 мл; бромтимоловый синий (1,6% водный раствор) 3 мл; агар микробиологический 15,0 г; NaOH 4% раствор 2,6–3,0 мл; растворяют при нагревании все компоненты, затем добавляют бензоат натрия (CAS 532-32-1) 1,0–2,0 г: корректируют до pH 7,2±0,2; стерилизуют при 121°C в течение 20 мин, разливают в стерильные чашки Петри. Питательная среда имеет зеленую окраску, прозрачная, пригодна к использованию в течение 30 сут при хранении от 4°C до 8°C. Контроль питательной среды при приготовлении: суточные культуры контрольных штаммов (клинические штаммы *A. baumannii* и *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*) засевают петлей в виде бляшки диаметром 5 мм на поверхность исследуемой среды в чашке Петри, инкубируют аэробно при 37°C в течение 18 ч, учитывают результат: питательная среда пригодна к использованию, если вокруг газона бактерий штамма *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* имеется четко выраженная зона темно-коричневой окраски питательной среды (положительный контроль) при отсутствии зоны окраски питательной среды вокруг газона бактерий штамма *A. baumannii* (отрицательный контроль).

Применение питательной среды. Исследуемый материал — суточные агаровые культуры *A. baumannii* засевают петлей на поверхность питательной среды в виде бляшки в отдельных секторах чашки Петри ($^1/_8$ часть чашки), инкубируют аэробно при 37°C в течение 18 ч, затем учитывают результат. Наличие вокруг газона бактерий зоны темно-коричневой окраски питательной среды указывает на принадлежность данного штамма *A. baumannii* к биовару *tryptophandestruens.*

Питательная среда для идентификации суббиоваров A и B бактерий A. baumannii bv. tryptophandestruens по хромогенной биотрансформациии L-триптофана и методика ее применения. Состав и приготовление питательной среды такие же, как питательной среды с бензоатом натрия, в которой бензоат натрия заменен L-триптофаном в равном количестве (1,0–2,0 г). Для биологического контроля питательной среды используют клинические штаммы *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* положительные по хромогенной биотрансформации L-триптофана и отрицательные по хромогенной биотрансформации L-триптофана.

Применение питательной среды. Питательную среду для хромогенной биотрансформации L-триптофана используют совместно с питательной средой для хромогенной биотрансформации бензоата натрия по одинаковой методике. Наличие вокруг газона штамма бактерий *A. baumannii* темно-коричневой окраски среды на питательной среде с бензоатом натрия и питательной среде с L-триптофаном указывает на принадлежность штамма к биовару *tryptophandestruens* суббиовару A. Наличие вокруг газона штамма *A. baumannii* темно-коричневой окраски среды на питательной среде с бензоатом натрия и отсутствие окраски среды на питательной среде с L-триптофаном указывает на принадлежность штамма к биовару *tryptophandestruens* суббиовару B.

Питательная среда для выявления A. baumannii bv. tryptophandestruens по хромогенной биотрансформации антраниловой кислоты. Состав и применение среды такие же, как среды с бензоатом натрия, в которой бензоат натрия заменен антраниловой кислотой (1 г/л) и увеличено количество NaOH для приведения pH к 7,2. Применение среды такое же, как среды с бензоатом натрия. Появление темно-коричневой окраски питательной среды вокруг газона бактерий через 18–24 ч инкубации при 37°C идентифицирует бактерии *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens.*

Методика постановки тестов для фенотипической идентификации бактерий группы A. baumannii. Отношение бактерий к окраске по Граму, морфологию и подвижность изучали микроскопическим методом. Наличие каталазы устанавливали тестом с 3% раствором пероксида водорода. Цитохромоксидазу определяли тестом с 1% водным раствором тетраметилпарафенилендиамина по появлению синей окраски бактерий через 20 с. Для проведения окислительно-ферментативного теста с глюкозой использовали среду Хью–Лейфсона. Нитратредуктазу и быструю уреазу (в течение 3 ч) выявляли, используя среды и реактивы микрообъемной тест-системы «Рапид-Энтеро» (НИИЭМ имени Пастера). Утилизацию субстратов в качестве единственных источников углерода проводили на плотной минимальной солевой среде по методике, изложенной в [3]. Использовали следующие субстраты: D-глюкоза, бензоат натрия, L-арабиноза, гиппурат натрия, антраниловая кислота, L-триптофан, L-орнитин, L-фенилаланин отечественного производства и путресцин производства Merck (Германия).

Идентификация видов бактерий методом MALDI-ToF MS. Использовали настольный MALDI-ToF масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Германия) в соответствии с инструкцией по применению.

Результаты

При исследовании отношения бактерий биовара *tryptophandestruens A. baumannii* к различным ароматическим соединениям нами неожиданно была обнаружена интенсивная хромогенная биотрансформация ими бензоата натрия, а также бензоата калия и бензойной кислоты. Темно-коричневая хромогенная реакция с бензоатом натрия полностью совпадала у всех штаммов биовара с хромогенной биотрансформацией антраниловой кислоты, характерной для этого биовара. Высокая специфичность хромогенной биотрансформации бензоата натрия была подтверждена отсутствием ее у остальных штаммов *A. baumannii* (кроме биовара), у прочих видов ацинетобактеров *A. nosocomialis* (n = 8), *A. pittii* (n = 8), *A. soli* (n = 4), *A. baylyi* (n = 10), *A. calcoaceticus* (n = 1), а также 34 видов других 22 родов *(Pseudomonas, Burkholderia, Stenotrophomonas, Alcaligenes, Shewanella, Klebsiella, Proteus, Morganella, Providentia, Escherichia, Shigella, Salmonella, Kluyvera, Serratia, Hafnia, Enterobacter, Citrobacter, Yersinia, Vibrio, Bacillus, Staphylococcus, Enterococcus).* Учитывая безопасность и широкую доступность бензоата натрия в качестве консерванта пищевых продуктов (пищевая добавка Е 211), это вещество было использовано нами для метода идентификации биовара *tryptophandestruens A. baumannii.* Были созданы две плотных хромогенных питательных среды, содержащих раздельно бензоат натрия для выявления по его биотрансформации биовара *tryptophandestruens* и L-триптофан для выявления по его биотрансформации суббиоваров этого биовара. Методика приготовления этих сред и их совместного применения изложена в разделе «Материалы и методы».

Предложенным методом были идентифицированы среди 210 первичных клинических изолятов *A. baumannii*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2021 и 2022 гг., 42 штамма *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*, в том числе впервые обнаружены его суббиовары А (27 таммов) и В (15 штаммов). Установлены фенотипические признаки биовара и его суббиоваров А и В. Все штаммы биовара *tryptophandestruens* вызывали хромогенную биотрансформацию бензоата натрия, антраниловой кислоты и не утилизировали в качестве единственного источника углерода L-арабинозу и гиппурат натрия. Штаммы суббиовара А отличались наличием хромогенной биотрансформации L-триптофана, а также не утилизировали L-орнитин и путресцин. Штаммы суббиовара В отличались отсутствием хромогенной биотрансформации L-триптофана, а также утилизировали L-орнитин и путресцин (табл. 1). Все штаммы биовара *tryptophandestruens* не утилизировали бензоат натрия, антраниловую кислоту, L-триптофан, но интенсивно утилизировали L-фенилаланин.

Разработанным методом идентификации биовара *tryptophandestruens A. baumannii* установлена частота распространения этого биовара и его суббиоваров среди первичных клинических изолятов *A. baumannii*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2021 и 2022 гг. (табл. 2).

В 2021 г. среди 108 штаммов *A. baumannii* выявлены 28 штаммов биовара (25,9 ±4,2%), в том числе суббиовара А — 20 штаммов (18,5±3,7%), суббиовара В — 8 штаммов (7,4±2,5%). В 2022 г. среди 102 штаммов *A. baumannii* быпи обнаружены 14 штаммов биовара (13,7±3,4%), в том числе 7 штаммов суббиовара А (6,85±2,5%) и 7 штаммов суббиовара В (6,85±2,5%). Всего за 2021 и 2022 гг. среди 210 штаммов *A. baumannii* были выделены 42 штамма биовара *tryptophandestruens* (20,0±3,5%), в том числе суббиовара А — 27 штаммов (12,9±2,3%) и суббиовара В — 15 штаммов (7,1±1,7%).

Диагностическая чувствительность выявления штаммов биовара *tryptophandestruens A. baumannii* повысилась за счет дополнительного выявления штаммов суббиовара В.

Таблица 1. Фенотипические признаки штаммов *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* суббиоваров А и В
Table 1. Phenotypic features *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* subbiovars A and B strains

Фенотипические признаки Phenotype features	***A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* subbiovar A (n = 27)**	***A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* subbiovar B (n = 15)**
Хромогенная биотрансформация/Chromogenic biotransformation		
Бензоат натрия/Sodium benzoate	+*	+
Антраниловая кислота/Anthranilic acid	+	+
L-Триптофан/L-Tryptophan	+	–
Утилизация/Utilization		
L-Арабиноза/L-Arabinose	–**	
Гиппурат натрия/Sodium hippurate		
L-Орнитин/L-Ornithine		+
Путресцин/Putrescine	–	+

Примечание. * — все штаммы положительные; ** — все штаммы отрицательные.
Note. * — all strains are positive; ** — all strains are negative.

Таблица 2. Частота штаммов *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* среди первичных штаммов *A. baumannii*, выделенных в 2021–2022 гг.

Table 2. Frequency of *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* strains among primary *A. baumannii* strains isolated in 2021–2022 years

Годы выделения штаммов Years of strains isolation	**Число первичных штаммов *A. baumannii*** Number of primary strains of *A. baumannii*	**Из них штаммов *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*, абс. M±m%** Of these, *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* strains abs. M±m%		
		суббиовар A subbiovar A	**суббиовар B** subbiovar B	**всего биовар *tryptophandestruens*** total biovar *tryptophandestruens*
2021	108	20 18,5±3,7	8 7,4±2,5	28 25,9±4,2
2022	102	7 6,85±2,5	7 6,85±2,5	14 13,7±3,4
2021 и 2022	210	27 12,9±2,3	15 7,1±1,7	42 20,0±3,5

Обсуждение

Нами впервые выявлено свойство бактерий биовара *tryptophandestruens A. baumannii* осуществлять хромогенную биотрансформацию бензойной кислоты и ее солей — бензоата натрия и бензоата калия. Хромогенную биотрансформацию бензоата натрия вызывали все штаммы этого биовара и не вызывали все изученные штаммы других видов ацинетобактеров *(A. pittii, A. nosocomialis, A. calcoaceticus, A. soli, A. baylyi)* и 34 видов других 22 родов бактерий. Ранее нами была выявлена хромогенная биотрансформация антраниловой кислоты (орто-аминобензойной кислоты) всеми штаммами этого биовара *A. baumannii* [3], что указывает на равную таксономическую значимость этих тестов, специфичность и возможность использовать признак хромогенной биотрансформации бензоата натрия в качестве маркера биовара *tryptophandestruens A. baumannii*. Известно, что аэробная деградация L-триптофана до антранилата (антранилатный путь) осуществляется некоторыми бактериями *(Pseudomonas aeruginosa, Ralstonia metallidurans)* трехступенчато с участием ферментов триптофан-2,3-диоксигеназы (ген *kynA*), кинуренинформамидазы (ген *kynB*) и кинурениназы (ген *kynU*) [4]. Химическая сущность дальнейших химических реакций антранилата натрия и бензоата натрия при их хромогенной биотрансформации неизвестна.

В ходе исследований были обнаружены два суббиовара биовара *tryptophandestruens A. baumannii*. Оба суббиовара вызывали хромогенную биотрансформацию бензоата натрия и антраниловой кислоты, не утилизировали L-арабинозу и гиппурат натрия; суббиовар A отличался наличием хромогенной биотрансформации L-триптофана, не утилизировал L-орнитин и путресцин; суббиовар B отличался отсутсвием хромогенной биотрансформации L-триптофана, утилизировал L-орнитин и путресцин. Оба суббиовара интенсивно утилизировали L-фенилаланин, что позволяет выделять их на селективной питательной среде «Ацинетобактер фенилаланин агар» [2].

Разработан и апробирован метод идентификации биовара *tryptophandestruens A. baumannii* и его суббиоваров двумя тестами на плотных хромогенных средах. Положительный результат теста на хромогенную биотрансформацию бензоата натрия на хромогенной среде с бензоатом натрия выявляет принадлехность штамма бактерий к биовару *tryptophandestruens A. baumannii*. Положительный результат теста на хромогенную биотрансформацию L-триптофана на хромогенной среде с L-триптофаном указывает на принадлежность штамма бактерий к суббиовару A этого биовара. Отрицательный результат теста на хромогенную биотрансформацию L-триптофана на хромогенной среде с L-триптофаном свидетельствует о принадлежности штамма бактерий к суббиовару B. Метод обеспечивает повышение диагностической чувствительности идентификации биовара за счет дополнительного выявления суббиовара B в сравнении с предыдущей методикой, в которой использовалась только хромогенная среда с L-триптофаном. Метод доступен для лабораторий любого уровня и может применяться для изучения экологии и эпидемиологии возбудителей ацинетобактерной инфекции. Данным методом была установлена частота распространения бактерий биовара *tryptophandestruens* среди первичных клинических изолятов *A. baumannii* в Санкт-Петербурге: в 2021–2022 гг. среди 210 изолятов были обнаужены 42 штамма биовара *tryptophandestruens* (20,0±3,5%), в том числе 27 штаммов (12,9±2,3%) суббиовара A и 15 штаммов (7,1±1,7%) суббиовара B.

В связи с существенным значением в патогенезе заболеваний человека нарушений метаболизма бензойной кислоты и ароматических аминокислот [1], представляет интерес исследование химического механизма хромогенной биотрансформации бензоата натрия, антра-

ниловой кислоты, L-триптофана бактериями биовара *tryptophandestruens A. baumannii*, а также изучение особенностей их патогенности и лекарственной резистентности.

Заключение

Впервые выявлена хромогенная биотрансформация бензоата натрия (бензойной кислоты) бактериями биовара *tryptophandestruens A. baumannii* и установлена таксономическая значимость ее как маркера этого биовара. Обнаружены два суббиовара бактерий биовара *tryptophandestruens* и определенны их отличительные признаки. Разработан метод идентификации бактерий биовара *tryptophandestruens A. baumannii* и его суббиоваров А и В хромогенными средами с бензоатом натрия и L-триптофаном. Повышена диагностическая чувствительность идентификации бактерий биовара *tryptophandestruens* ввиду дополнительного выявления бактерий суббиовара В. Установлена частота распространения штаммов биовара *tryptophandestruens* и его суббиоваров среди первичных клинических изолятов *A. baumannii* в Санкт-Петербурге в 2021–2022 гг.: штаммов биовара — 20,0±3,5%, в том числе суббиовара А – 12,9±2,3%, суббиовара В – 7,1±1,7%.

Благодарности

Авторы благодарят старшего лаборанта кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Белогурову Татьяну Борисовну за помощь в исследованиях.

Список литературы/References

1. Белобородова Н.В., Осипов А.А., Бедова А.Ю. Биологические свойства некоторых низкомолекулярных ароматических микробных метаболитов, ассоциированных с сепсисом // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58, № 7–8. С. 48–61. [Beloborodova N.V., Osipov A.A., Belova A.Yu. Biological properties of some sepsis-associated low molecular aromatic microbial metabolism. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy, 2013, vol. 58, no. 7–8, pp. 48–61 (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 caicoaceticus–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 nfection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 5, pp. 591–596. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2020-7619-ASS-1177*
3. Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Старкова Д.А., Михайлоов Н.В., Горелова Г.А. Acinetobacter baumannii bv. Tryptophandestruens bv. nov., выделенный из клинического материала // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 5. С. 965–972. [Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Starkova D.A., Mikhailov N.V., Gorelova G.V. Acinetobacter baumannii bv. Tryptophandestruens bv. nov., isolated from clinical samples. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 965–972 (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-ABB-1676*
4. Kurnasov O., Jablonski L., Polanuyer B., Dorrestein P., Begley T., Osterman A. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol. Lett., 2003, vol. 227, no. 2. pp. 213–227. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00684-0*

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;

Горелова Г.В., зав. лабораторией 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;

Gorelova G.V., Head of the Laboratory of Bacteriology, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.05.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 01.05.2023
Accepted 21.06.2023

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»**.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авдиенко В.Г. ... 439
Андреева Н.В. ... 526
Ахматова Н.К. ... 430
Барило А.А. ... 567
Беленюк В.Д. ... 446
Борисов А.Г. ... 446
Бочарова И.В. ... 439
Брызгалова Д.А. ... 481
Бурова Л.А. ... 409
Бывалов А.А. ... 573
Ваняркина А.С. ... 497
Власенко А.Е. ... 430
Гончарова Н.С. ... 506
Горбунов С.Г. ... 579
Горелова Г.В. ... 591
Давыдова Н.В. ... 469
Даренская М.А. ... 497
Дмитриева М.И. ... 526
Дубянский В.М. ... 535
Дудина Л.Г. ... 573
Евстифеев В.В. ... 439
Еремеев В.В. ... 439
Ефимушкина О.А. ... 469
Захарова Ю.В. ... 517
Зуев Е.В. ... 457
Иккес Л.А. ... 446
Казаков С.П. ... 469
Каликян З.Г. ... 586
Кожухова Е.А. ... 526
Колесников С.И. ... 497
Колесникова Л.И. ... 497
Конышев И.В. ... 573
Костинов М.П. ... 430
Краева Л.А. ... 591
Кудрявцев И.В. ... 446
Кулемзин С.В. ... 457
Литвинова Н.А. ... 457
Мазанкова Л.Н. ... 579
Малецкая О.В. ... 535
Мартынова Г.П. ... 446
Мельникова Е.В. ... 591
Морозова Н.А. ... 573
Москалева Е.В. ... 497
Назарова Л.В. ... 481
Николаенко С.Л. ... 526
Оськин А.Н. ... 579
Отдушкина Л.Ю. ... 517
Петрова А.Г. ... 497
Пигаревский П.В. ... 409
Платонов А.Е. ... 535
Полищук В.Б. ... 430
Попкова М.И. ... 481
Прислегина Д.А. ... 535
Путков С.Б. ... 469
Пьянзова Т.В. ... 517
Решетняк Д.В. ... 469
Рычкова Л.В. ... 497
Савченко А.А. ... 446
Сахарнов Н.А. ... 481
Семенова Н.В. ... 497
Сиволодский Е.П. ... 591
Смирнова О.В. ... 506
Смирнова С.В. ... 567
Соболева Е.А. ... 481
Столпникова В.Н. ... 430
Суворов А.Н. ... 409
Сходова С.А. ... 430
Таран Т.В. ... 535
Тотолян Артем А. ... 409
Уткин О.В. ... 481
Филатова Е.Н. ... 481
Фунтиков А.А. ... 457
Холодов А.А. ... 517
Хромова Е.А. ... 430
Шепелькова Г.С. ... 439
Шмитько А.Д. ... 430
Шукуров Р.Р. ... 457
Abolghasemi S. ... 559
Akbari R. ... 559
Asgharpour M. ... 559
Ataei F. ... 549
Barari M. ... 559
Baziboroun M. ... 559
Beheshti S. ... 549
Ebrahimpour S. ... 559
Foroozanfar Z. ... 549
Geraili Z. ... 559
Jamali E. ... 549
Joulaei H. ... 549
Negahban H. ... 559
Nikoupour H. ... 559
Oliaie F. ... 559
Rezaei E. ... 549
Roozbeh J. ... 559
Shafiekhani M. ... 559
Yahyapour Y. ... 559
Zare Z. ... 559

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергены ... 567
аллергия ... 567
антибиотики ... 586
антитела к полноформатному тримеризованному S-белку ... 469
антитела к РСД S-белка ... 469
бактериологическое исследование ... 506
бактериофаг ... 573
безадъювантная вакцина ... 430
бензоат натрия ... 591
биовар *tryptophandestruens* ... 591
буллезный лекарственный дерматит ... 586
вакцина ... 469
вакцины против гриппа ... 430
васкулит ... 586
вирус Эпштейна–Барр ... 481
вирусная нагрузка ... 497
вируснейтрализующие антитела ... 457
возраст детей ... 446
воспаление ... 497
ВЭБ-1 ... 481
ВЭБ-2 ... 481
гемоколит ... 526
геноварианты ... 481
гликолипопротеин ... 439
грибки ... 567
день болезни на момент госпитализации 526
дети ... 497
дети раннего возраста ... 579
дисбиоз слизистой полости носа ... 506
идентификация ... 591
иммунитет ... 457
иммуноадъювантная вакцина ... 430
иммуногенность вакцин ... 430
иммунокомпетентные клетки ... 579
иммунофенотип лимфоцитов ... 430
интерлейкины ... 497
инфекционный мононуклеоз ... 446, 481
исходы заболевания ... 579
клеточный иммунитет ... 430
клещевые трансмиссивные инфекции ... 535
климатические факторы ... 535
клиническая картина ... 579
клинический случай ... 586
колит ... 526
лазерная ловушка ... 573
лизосома ... 439
макуло-папуллезная экзантема ... 586
микробиом ... 517
микрофлора ... 506
модель динамики заболеваемости «прогнозная» ... 535
модель динамики заболеваемости «объясняющая» ... 535
мониторинг ... 469
моноциты ... 446
новая коронавирусная инфекция ... 469
новорожденные ... 497
«объясняющая» модель ... 535
окислительный стресс ... 497
острая диарея ... 526
патогенные бактерии ... 506
поствакцинальный иммунитет ... 469
постстрептококковый гломерулонефрит факторы нефритогенности ... 409
пробиотики ... 517
прогнозирование заболеваемости ... 535
протекция ... 439
псевдовирусные частицы ... 457
ПЦР ... 481, 526
реакции лекарственной гиперчувствительности ... 586
реакция нейтрализации ... 457
розацеа ... 567
ротавирусная инфекция ... 579
сапозин D ... 439
свойства микроорганизмов ... 517
секвенирование ... 481
сенсибилизация ... 567, 573
«СпутникV» ... 469
стрептококковые Fcγ-связывающие белки ... 409
суббиовары A и B ... 591
субпопуляции ... 446
терапия ... 517
туберкулез ... 439
туберкулез легких ... 517
уровень антител ... 469
фагоцитарная активность ... 446
фенотип ... 506
хромогенная биотрансформация ... 591
хронический ринит ... 506
эпидемиологическая ситуация ... 535
эритема ... 567
Acinetobacter baumannii ... 591
AIDS ... 549
Campylobacter spp. ... 526
complications ... 559
COVID-19 ... 457, 497, 559, 586
human immunodeficiency virus ... 549
kidney transplant ... 559
LMP-1 ... 481
long-COVID-19 ... 559
L-триптофан ... 591
M. tuberculosis ... 439
post-COVID-19 ... 559
prolonged symptoms ... 559
protein C ... 549
protein S ... 549
SARS-CoV-2 ... 457, 469
Streptococcus pyogenes ... 409
thrombosis ... 549
TLR ... 579
venous thromboembolism ... 549
Yersinia pestis ... 573
Yersinia pseudotuberculosis ... 573

Иллюстрации к статье «Влияние сапозина D на течение туберкулезной инфекции у мышей» (авторы: Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, В.Г. Авдиенко, И.В. Бочарова, В.В. Еремеев) (с. 439–445)

Illustrations for the article "The effect of saposin D on the anti-tuberculosis immune response in experimental tuberculosis infection" (authors: Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Avdienko V.G., Bocharova I.V., Yeremeev V.V.) (pp. 439–445)

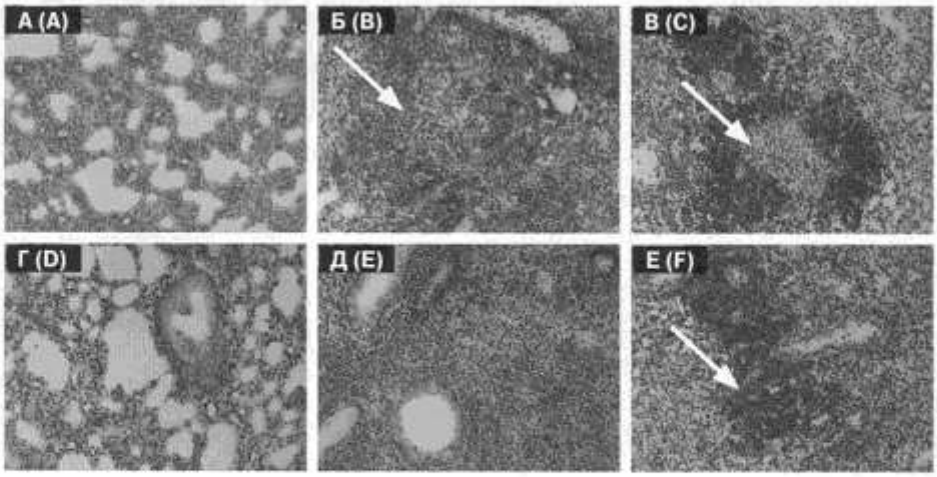


Рисунок 3. Гистологическая картина специфического воспаления в легких мышей B6 дикого типа (А–В) и SapD-ko (Г–Е) через 21 (Б, Д) и 35 дней (В, Е) после инфицирования низкой дозой *M. tuberculosis* (100 КОЕ/мышь)

Figure 3. Histological pattern of B6 wild-type (A–C) and SapD-ko (D–F) mouse specific inflammation in the lungs at day 21 (B, E) and day 35 (C, F) post low dose of *M. tuberculosis* (100 CFU/mouse) infection

Примечание. На срезах средней правой доли легкого, окрашенных гематоксилином и эозином, исследовали зоны туберкулезного воспаления при увеличении ×100. А — срез легкого «наивных» B6; Г — срез легкого наивных SapD-ko. Стрелками показаны места формирования гранулем.

Note. The TB inflammation zones were examined on the lung middle right lobe sections stained with hematoxylin and eosin (magnification is ×100). A — a "naive" B6 lung's section; D — a "naive" section SapD-ko lung's section. Arrows show the sites of granuloma formation.

Иллюстрации к статье «Реакции гиперчувствительности к антибиотикам в период пандемии COVID-19» (автор: З.Г. Каликян) (с. 586–590)

Illustrations for the article "Antibiotics hypersensitivity reactions during COVID-19 pandemic" (author: Kalikyan Z.G.) (pp. 586–590)

Рисунок 1. Пациентка, 58 лет, с макуло-папуллезной экзантемой

Figure 1. A 58-year-old female patient with maculopapular exanthem

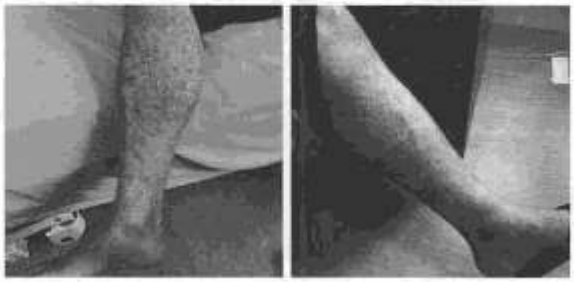


Рисунок 2. Пациент, 53 года, с клиническими проявлениями васкулита

Figure 2. A 53-year-old male patient with clinical manifestations of vasculitis

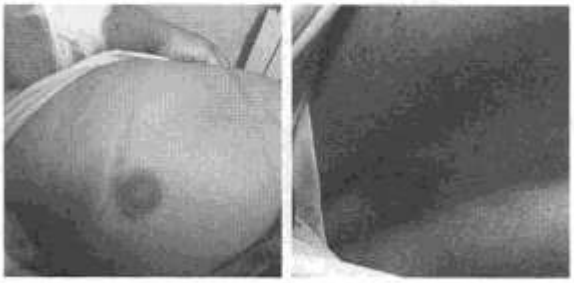


Рисунок 3. Пациентка, 64 года, с эрозиями на местах вскрывшихся булл

Figure 3. A 64-year-old female patient with erosions at the sites of opened bullae