Том 13, № 4. С. 601–800

ISSN 2220-7619 (print)
ISSN 2313-7398 (online)

2023

# 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

июль–август
**2023, том 13** **№ 4**

*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 25.08.2023 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1253

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)

July–August

**2023, volume 13** **No. 4**

*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.
Tel.: (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 25.08.2023. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

# СОДЕРЖАНИЕ

## Обзоры



## Оригинальные статьи

## Краткие сообщения



## История науки

# CONTENTS

## Reviews



## Original articles

## Short communications



## Science history

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 609–626

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 609–626

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ ESKAPE И NK-КЛЕТОК: ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И РОЛЬ В РАЗВИТИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПАТОЛОГИЙ

**П.В. Гребенкина[1,2], С.А. Сельков[1], Л.А. Краева[2], Д.И. Соколов[1,2]**

[1] *ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Естественные киллеры (NK-клетки) являются одной из групп лимфоцитов врожденного иммунитета. Часто NK-клетки изучают в контексте противоопухолевого и противовирусного иммунитета, а из-за нахождения в зоне границы контакта матери и плода (в матке) активно изучают их роль в развитии беременности. При этом их участие в антибактериальном иммунном ответе недостаточно изучено. Поскольку NK-клетки могут продуцировать цитокины, одним из возможных вариантов их участия в элиминации прокариотических патогенов является регуляция клеток иммунной системы — дендритных клеток, макрофагов и др. Однако в литературе также описаны варианты контактного цитолиза клеток, подвергшихся заражению внутриклеточными бактериями. Это возможно благодаря содержанию цитотоксических белков — перфорина, гранзимов, гранулизина в NK-клетках. В последние годы стало известно об участии NK-клеток в развитии иммунного ответа в отношении внеклеточных бактерий, в том числе группы ESKAPE, в состав которой входят условно-патогенные прокариоты, наиболее активно развивающие антибиотикорезистентность и вызывающие внутрибольничные инфекции. В обзоре авторами предпринята попытка обобщения данных научной литературы о роли NK-клеток в антибактериальном иммунитете. Изучение взаимодействия бактерий группы ESKAPE и NK-клеток также привлекает исследователей в связи со способностью прокариот изменять функции клеток иммунной системы, однако об оказываемых на NK-клетки эффектах известно крайне мало. При этом такие данные могли бы найти применение в аспекте поиска новых способов лечения онкологических заболеваний, а также стать основой для разработки новых подходов к регуляции характеристик NK-клеток при репродуктивных патологиях. Как упоминалось ранее, NK-клетки встречаются в децидуальной оболочке, где могут взаимодействовать с клетками плода, в том числе с клетками трофобласта. На сегодняшний день считается, что клетки могут взаимно регулировать свойства друг друга, что необходимо для протекания физиологической беременности. Вероятно, нарушение баланса в этой системе способно привести к развитию репродуктивных патологий. В обзоре суммированы имеющиеся на сегодняшний день данные об эффектах бактерий группы ESKAPE на NK-клетки, а также рассмотрены возможные механизмы развития нарушений взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта под влиянием бактерий группы ESKAPE. Поскольку в литературе нами встречено мало данных об этом явлении, экспериментальное изучение влияния бактерий группы ESKAPE на свойства NK-клеток видится необходимым этапом развития современной биологии.

***Ключевые слова:*** *NK-клетки, бактерии ESKAPE, трофобласт, антибактериальный иммунитет, репродуктивные патологии, цитокины, фенотип, цитотоксичность.*

**Адрес для переписки:**
Гребенкина Полина Владимировна
199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3, ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта.
Тел.: 8 905 802-85-58. E-mail: grebenkinap@gmail.com

**Contacts:**
Polina V. Grebenkina
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Mendeleyevskaya line, 3, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott.
Phone: +7 905 802-85-58. E-mail: grebenkinap@gmail.com

**Для цитирования:**
Гребенкина П.В., Сельков С.А., Краева Л.А., Соколов Д.И. Взаимодействие бактерий группы ESKAPE и NK-клеток: взаимная регуляция и роль в развитии репродуктивных патологий // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 609–626. doi: 10.15789/2220-7619-CBE-15452

**Citation:**
Grebenkina P.V., Selkov S.A., Kraeva L.A., Sokolov D.I. Crosstalk between ESKAPE bacteria and NK cells: mutual regulation and role in developing reproductive tract pathologies // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 609–626. doi: 10.15789/2220-7619-CBE-15452



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CBE-15452

## CROSSTALK BETWEEN ESKAPE BACTERIA AND NK CELLS: MUTUAL REGULATION AND ROLE IN DEVELOPING REPRODUCTIVE TRACT PATHOLOGIES

**Grebenkina P.V.[a,b], Selkov S.A.[a], Kraeva L.A.[b], Sokolov D.I.[a,b]**

[a] *Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Natural killer (NK) cells represent one of the innate lymphoid cell subsets, which are often studied in the context of antitumor and antiviral immunity, as well as due to their localization in the zone of the mother-fetus contact (in the uterus), therefore underlying their extensive investigation in developing pregnancy. At the same time, their role in antibacterial immune response has been poorly examined. Because NK cells can produce cytokines, one of putative options for their participation in eliminating prokaryotic pathogens may be coupled to regulation of immune system cells such as dendritic cells, macrophages, etc. However, there have been also described variants of contact cytolysis of cells infected with intracellular bacteria enabled due to cytotoxic proteins — perforin, granzymes, granulisin found in NK cells. In recent years, it has become known that NK cells take part in development of immune response against extracellular bacteria including the ESKAPE group bacteria, which includes opportunistic prokaryotes that most actively develop antibiotic resistance and cause nosocomial infections. Here, we attempted to review the data on the role NK cells play in antibacterial immunity. Assessing a crosstalk between ESKAPE group bacteria and NK cells also attracts researchers due to the ability of prokaryotes to alter functions of immune cells, but very little is known about the effects they exert on NK cells. At the same time, such data could be applied to seek out for new ways to treat oncological diseases as well as pave the basis for new approaches to regulating NK cell characteristics in reproductive pathologies. As mentioned earlier, the latter occur in the decidual membrane, where they can interact with fetal cells including trophoblast cells. It is believed that cells can mutually regulate each other's properties necessary for the course of physiological pregnancy. Probably, imbalance in this system can lead to development of reproductive pathologies. The review summarizes the currently available data on the effects of ESKAPE group bacteria on NK cells, and also considers putative mechanisms for emergence of impaired interaction between NK cells and trophoblasts exposed to ESKAPE group bacteria. Owing to few publications available on this phenomenon, the experimental study assessing an impact of ESKAPE group bacteria on NK cell properties is envisioned as a necessary stage in development of contemporary biology.

***Key words:*** *NK cells, ESKAPE bacteria, trophoblast, antibacterial immunity, reproductive pathologies, cytokines, phenotype, cytotoxicity.*

## Введение

Естественные киллеры (NK-клетки) — лимфоциты врожденного иммунитета, основными функциями которых являются участие в противоопухолевом и противовирусном иммунитете и в регуляции пролиферативных процессов [108, 148]. Они реализуются благодаря наличию цитотоксических белков внутри NK-клеток, а также продукции широкого спектра цитокинов. В литературе также описано участие NK-клеток в реакциях, направленных на элиминацию внутриклеточных бактерий [91].

В последние годы появились исследования, свидетельствующие о способности NK-клеток регулировать иммунный ответ против внеклеточных бактерий, в том числе группы ESKAPE [111], однако механизмы этого явления не изучены.

В свою очередь бактерии группы ESKAPE, вероятно, также могут влиять на характеристики NK-клеток. Описано изменение секреции цитокинов и цитотоксических свойств NK-клеток после взаимодействия с бактериями группы ESKAPE [23, 72].

Поскольку NK-клетки обнаруживаются не только в периферической крови, но и локально, в тканях, взаимодействие с бактериями группы ESKAPE может влиять на местные процессы. Так, одной из популяций NK-клеток являются NK-клетки матки, которые тесно контактируют с клетками трофобласта [3, 78, 105]. Клетки взаимно регулируют функции друг друга, и нарушение баланса в этой системе может приводить к репродуктивным патологиям [147]. К аналогичному исходу может привести изменение характеристик NK-клеток под влиянием бактерий группы ESKAPE. Косвенно об этом свидетельствуют обнаружение в эндометрии женщин с установленным бесплодием *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* [32], однако механизмы этого явления также не изучены.

Таким образом, целью обзора было рассмотрение известных на сегодняшних день данных о взаиморегуляции NK-клеток и бактерий группы ESKAPE, а также анализ возможных эффектов этого процесса в развитии репродуктивных патологий.

## Бактерии группы ESKAPE: характеристика представителей группы и роль в здравоохранении

В 2009 г. Американское Общество по Инфекционным Заболеваниям (Infectious Diseases Society of America) опубликовало отчет, в котором

подчеркнуло необходимость разработки новых антибактериальных препаратов против бактерий группы ESKAPE [14]. К бактериям этой группы относятся *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp., проявляющие множественную устойчивость к различным классам антибиотиков, вызывающие тяжелые инфекции [127].

В 2018 г. ВОЗ обновила список бактерий, для борьбы с которыми необходимо разрабатывать новые антимикробные препараты [144]. В этот список вошли 20 видов бактерий, в том числе 6 представителей группы ESKAPE, перечисленные выше.

*E. faecium* — грамположительные бактерии, распространенные возбудители внутрибольничных инфекций, в основном представляющие опасность для иммунокомпрометированных пациентов [83]. Показано, что существует две популяции бактерий. Представители одной популяции являются частью нормального микробиома ЖКТ, а представители другой — госпитальной — возбудителями клинически значимых форм инфекции [43, 92].

*S. aureus* — грамположительные бактерии, вызывающие как внебольничные, так и госпитальные инфекции, в том числе пневмонию и инфекции сердечно-сосудистой системы. Из-за распространенности инфекций, вызываемых *S. aureus,* также вскоре после начала эры антибиотиков возникли сначала резистентные к пенициллину штаммы [93], а затем и метициллин-резистентные штаммы, являющиеся на сегодняшний день серьезной медицинской проблемой [21, 37].

*K. pneumoniae* — грамотрицательные бактерии, являющиеся условными патогенами. У пациентов со сниженным иммунитетом они вызывают пневмонии, сепсис, инфекции половых путей. Вирулентные и антибиотикорезистентные клоны способны вызывать нозокомиальные инфекции с тяжелыми последствиями [12].

*A. baumannii* — грамотрицательные бактерии, вызывающие внутрибольничные инфекции — пневмонии, бактериемию и сепсис [101].

*P. aeruginosa* — грамотрицательные бактерии, представляющие угрозу для иммунокопрометированных пациентов [36]. *P. aeruginosa* даже дикого типа проявляет устойчивость к бета-лактамным антибиотикам [119]; широко распространены штаммы, резистентные к фторхинолонам, аминогликозидам [142].

Бактерии рода *Enterobacter* — грамотрицательные палочки, также вызывают внутрибольничные инфекции и характеризуются антибиотикоустойчивостью. Наиболее распространенными среди них возбудителями инфекций являются *E. aerogenes*, *E. cloacae* и *E. hormaechei* [30].

В табл. 1 представлены данные, отражающие вовлеченность бактерий группы ESKAPE в развитие инфекций, а также сведения о группах антибиотиков, к которым выработана резистентность.

В табл. 2 представлены данные о влиянии бактерий группы ESKAPE на клетки иммунной системы и молекулах, которые задействованы в этом процессе.

Таким образом, к группе ESKAPE отнесены бактерии — возбудители инфекционных заболеваний, лечение которых осложнено резистентностью патогенов ко многим антибактериальным препаратам. При этом представители данной группы, вероятно, могут оказывать влияние на ход лечения, регулируя функции клеток иммунной системы.

## NK-клетки: краткая характеристика, роль в антибактериальном иммунитете

В настоящее время под термином NK-клетки понимают лимфоидные клетки врожденного иммунитета, экспрессирующие на своей поверхности молекулы мембранного белка группы клеточной адгезии CD56 и лишенные CD3 — основного корецептора Т-клеточного рецептора [155]. Низкоафинный рецептор для антител класса IgG CD16 (FcγRIII — рецептор к гамма-цепи Fc-фрагмента IgG) также является важным маркерным рецептором естественных киллеров человека. Его поверхностная экспрессия необходима для реализации антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [155].

На поверхности NK-клеток расположены рецепторы, регулирующие их функции. Среди них выделяют белки семейства KIR [47, 165], NKG [169], NCR [1, 117]. В зависимости от результата взаимодействия с лигандом рецепторы NK-клеток подразделяют на активирующие и ингибирующие [126, 136]. Факторы микроокружения влияют на экспрессию рецепторов NK-клетками.

Основной функцией NK-клеток, помимо участия в пролиферативных процессах, считают участие в противоопухолевом [75, 159] и противовирусном иммунитете [24, 167]. Это возможно благодаря способности NK-клеток распознавать клетки, подвергшиеся трансформации и потерявшие способность экспрессировать молекулы MHC I. При взаимодействии с ними NK-клетки получают недостаточный ингибирующий сигнал, что приводит к активации NK-клеток. С другой стороны, развитие опухоли и вирусная инфекция вызывают клеточный стресс, сопровождающийся экспрессией рецепторов, например MICA/B, которые в свою очередь стимулируют активирующие

рецепторы на поверхности NK-клеток. В результате, происходит активация NK-клеток, приводящая к уничтожению клеток-мишеней за счет проявления NK-клетками цитотоксичности, либо опосредованно, через выделение провоспалительных цитокинов [118]. Цитотоксичность NK-клеток может реализовываться посредством цитотоксических белков. При активации NK-клеток начинается высвобождение литических гранул, содержащих гранзимы, гранулизин и перфорин. После адгезии NK-клетки к клетке-мишени и образования иммунологического синапса, литические гранулы транспортируются по микротрубочкам в направлении центра организации микротрубочек с помощью динеина, затем они поляризуются в направлении иммунологического синапса [60, 95]. Также возможна рецепторно-опосредованная цитотоксичность. NK-клетки экспрессируют «рецепторы смерти», например TRAIL-R, CD95 [106, 109], связывание которых с лигандами на поверхности клетки-мишени приводит к запуску апоптоза последней [57, 133]. Ранее также упоминалось о возможном развитии антителозависимой клеточной токсичности — при связывании антитела с CD16 (Fc-рецептором) на поверхности NK-клеток происходит выделение гранул цитотоксических белков [2].

Кроме осуществления реакций цитотоксичности NK-клетки могут служить в качестве регуляторов функций иммунной системы, синтезируя широкий спектр цитокинов. Провоспалительные цитокины IFNγ и TNFα являются важнейшими цитокинами, продуцируемыми NK-клетками и регулирующими их ци-

**Таблица 1. Характеристика бактерий группы ESKAPE**
Table 1. Characteristics of ESKAPE bacteria

| **Представитель группы ESKAPE**<br>Member of ESKAPE group | **Основные нозологии, вызываемые представителем группы ESKAPE**<br>Main related nosologies | **Устойчивость к антибиотикам**<br>Antibiotic resistance |
|---|---|---|
| ***E. faecium*** | **Бактериемия [9], инфекции мочевыводящих путей [27]**<br>Bacteremia [9], urinary tract infections [27] | **Трициклические гликопептиды (ванкомицин [48, 65]), оксазолидиноны (линезолид [65]), бета-лактамные антибиотики (ампициллин [123])**<br>Tricyclic glycopeptides (vancomycin [48, 65]), oxazolidinones (linezolid [65]), beta-lactam antibiotics (ampicillin [123]) |
| ***S. aureus*** | **Эндокардит [88], синдром токсического шока [131], пищевые отравления [110], кожные заболевания [124], болезни дыхательной системы [13], инфекции половых путей [130]**<br>Endocarditis [88], toxic shock syndrome [131], food poisoning [110], skin diseases [124], respiratory system diseases [13], genital tract infections [130] | **Бета-лактамные антибиотики (пенициллин [93], метициллин [21, 37] ), трициклические гликопептиды (ванкомицин [26]), мупироцин [29], липопептидные антибиотики (даптомицин [96]), оксазолидиноны (далбаванцин [81])**<br>Beta-lactam antibiotics (penicillin [93], methicillin [21, 37]), tricyclic glycopeptides (vancomycin [26]), mupirocin [29], lipopeptide antibiotics (daptomycin [96]), oxazolidinones (dalbavancin [81]) |
| ***K. pneumoniae*** | **Пневмония [42, 100], инфекции мочевыводящих путей [18], инфекции половых путей [130]**<br>Pneumonia [42, 100], urinary tract infections [18], genital tract infections [130] | **Аминогликозиды ([62]), карбапанемы ([62]), бета-лактамные антибиотики [71]**<br>Aminoglycosides ([62]), carbapenems ([62]), beta-lactam antibiotics [71] |
| ***A. baumannii*** | **Пневмония [107]**<br>Pneumonia [107] | **Бета-лактамные антибиотики [146], карбапанемы [31, 146], цефалоспорины [139]**<br>Beta-lactam antibiotics [146], carbapenems [31, 146], cephalosporins [139] |
| ***P. aeruginosa*** | **Инфекции дыхательной системы [13], инфекции половых путей [130]**<br>Respiratory infections [13], genital tract infections [130] | **Бета-лактамные антибиотики [119], цефалоспорины [137], хинолоны [68], карбапанемы [74]**<br>Beta-lactam antibiotics [119], cephalosporins [137], quinolones [68], carbapenems [74] |
| ***Enterobacter* spp.** | **Бактериемия [141, 161]**<br>Bacteremia [141, 161] | **Цефалоспорины [39, 98], карбапанемы [99], бета-лактамные антибиотики [30], хинолоны [98]**<br>Cephalosporins [39, 98], carbapenems [99], beta-lactam antibiotics [30], quinolones [98] |

**Таблица 2. Влияние бактерий группы ESKAPE на клетки иммунной системы и молекулы-индукторы этого процесса**

Table 2. The effect of ESKAPE bacteria on immune cells and relevant inducer molecules

| **Представитель группы ESKAPE** Member of ESKAPE group | **Антигены поверхностного аппарата или секретируемые** Surface apparatus or secreted antigens | **Лиганды на клетках иммунной системы** Ligands on immune system cells | **Влияние на характеристики клеток иммунной системы** Effect on immune cells |
|---|---|---|---|
| *E. faecium* | **Капсульный полисахарид из глюкозы и глицерофосфата [63]** Capsule polysaccharide from glucose and glycerophosphate [63] | **Нет данных** No data | **Индукция опсонизации и фагоцитоза [63]** Induced opsonization and phagocytosis [63] |
| | **Антиген А (секретируемая пептидогликангидролаза) [76]** Antigen A (secreted peptidoglycan hydrolase) [76] | **NOD2 [76]** | **Активация клеток врожденного иммунитета [76]** Activation of innate immunity cells [76] |
| *S. aureus* | **Стафилококковые энтеротоксины** Staphylococcal enterotoxins | **TLR2, TLR6 (энтеротоксин Б) [129], NLRP3, TLR4 (энтеротоксин О) [61]** TLR2, TLR6 (enterotoxin B) [129], NLRP3, TLR4 (enterotoxin O) [61] | **Усиление синтеза провоспалительных цитокинов (энтеротоксин Б) [10, 53], индукция пролиферации лимфоцитов (энтеротоксин Б) [53], активация Т-лимфоцитов (энтеротоксин А) [115], стимуляция синтеза провоспалительных цитокинов нейтрофилами (энтеротоксин О) [61]** Increased synthesis of pro-inflammatory cytokines (enterotoxin B) [10, 53], induction of lymphocyte proliferation (enterotoxin B) [53], activation of T-lymphocytes (enterotoxin A) [115], upregulated production of pro-inflammatory cytokines by neutrophils (enterotoxin O) [61] |
| *K. pneumoniae* | **Флагеллин** Flagellin | **TLR2, TLR5 [20]** | **Усиление секреции IFNγ NKT-клетками [20]** Increased secretion of IFNγ by NKT cells [20] |
| | **Белок внешней мембраны А** Outer membrane protein A | | |
| | **Капсульный полисахарид** Capsule polysaccharide | **Нет данных** No data | **Подавление фагоцитоза [114]** Suppressed phagocytosis [114] |
| *A. baumannii* | **Липополисахарид** Lipopolysaccharide | **TLR4 [122]** | **Активация продукции активных форм кислорода в нейтрофилах [69]** Enhanced production of reactive oxygen species in neutrophils [69] |
| *P. aeruginosa* | **Липополисахарид** Lipopolysaccharide | **TLR4 [122]** | **Усиление экспрессии PD-L1 моноцитами [8]** Upregulated PD-L1 expression by monocytes [8] |
| | **Флагеллин** Flagellin | **TLR5 [86]** | **Нет данных** No data |
| | **Биопленочная форма** Biofilm form | **CD209, дектин-2** CD209, dectin-2 | **Ингибирование активации дендритных клеток [135]** Suppressed dendritic cell activation [135] |
| *Enterobacter* spp. | **Липополисахарид** Lipopolysaccharide | **TLR4 [122]** | **Стимуляция продукции провоспалительных цитокинов моноцитами и макрофагами [7]** Enhanced proinflammatory cytokine production by monocytes and macrophages [7] |
| | **Порины внешней мемебраны** Porins of the outer membrane | **TLR4 [112]** | **Формирование иммунологической памяти и гуморального ответа [112]** Formation of immunological memory and humoral response [112] |

тотоксические свойства [157], кроме того, цитокины модулируют функции Т-клеток, макрофагов, дендритных клеток (DC) [19, 59]. NK-клетки секретируют RANTES, IL-1β, IL-10, GM-CSF, VEGF, TGFβ, LIF, IL-8, CXCL12 и другие цитокины [50], регулирующие их собственные свойства и характеристики микроокружения.

Помимо того, что NK-клетки известны как компонент противоопухолевого и противовирусного иммунитета, также известно об их участии в иммунных реакциях против внутриклеточных бактерий. Об этом свидетельствуют данные о повышенной частоте бактериальных инфекций у пациентов с дефицитом NK-клеток [34]. Взаимодействие NK-клеток и бактерий возможно благодаря экспрессируемым рецепторам врожденного иммунитета. Показана экспрессия TLR1 (от англ. Toll-like receptors — Toll-подобные рецепторы) [25], TLR2 [20, 38], TLR3 [38], TLR4 [38], TLR5 [20, 25], TLR7 [6, 154], TLR8 [6, 154], TLR9 [15, 154], лигандами некоторых из них являются компоненты бактериальных клеток.

Также на NK-клетках обнаруживаются рецепторы из группы NOD-подобных: NLRP3, NOD1, NOD2, лигандами которых являются фрагменты бактериальных клеток [102]. Установлено, что агонисты NLRP3, NOD1, NOD2 усиливают цитотоксическую функцию NK-клеток, продукцию ими TNFα, IFNγ [40]. Кроме опосредованного участия в антибактериальном иммунитете NK-клетки и продуцируемые ими микровезикулы могут содержать пептиды — дефензины α и β [20, 79], которые обладают подавляющим действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [150]. Также из NK-клеток был выделен NK-лизин [5], обладающий антибактериальной эффективностью [17, 90].

Установлено, что NK-клетки способны уничтожать эукариотические клетки, зараженные *Shigella flexneri*, причем этот процесс осуществлялся только после заражения инвазивным штаммом бактерии и усиливался после обработки NK-клеток IL-2 или IFNγ [77]. NK-клетки способны проявлять цитотоксичность по отношению к моноцитам, зараженным *M. tuberculosis*, причем заражение приводило к усилению цитотоксической активности NK-клеток [153]. В данном исследовании авторы связывают процесс с повышенной экспрессией активационного рецептора NKp46, что подтверждается снижением цитотоксической активности NK-клеток после блокирования рецептора.

Макрофаги, зараженные *M. tuberculosis*, вызывали повышение экспрессии NKp46, NKp30 и NKG2D NK-клетками периферической крови при совместном культивировании, кроме того, NKp46 и NKG2D оказались задействованы в лизисе зараженных макрофагов: при блокировании этих рецепторов количество погибших макрофагов было значительно ниже. При этом исследователи также провели анализ экспрессии маркеров стресса, лигандов NKG2D — при внутриклеточном заражении макрофаги усиливали экспрессию маркера стресса ULBP1, при блокировании молекулы лизис макрофагов NK-клетками снижался [152].

Некоторые исследователи указывают на необходимость взаимодействия NK-клеток с DC при инфекциях, вызванных внутриклеточными бактериями.

Так в 2003 г. исследователи выяснили, что это взаимодействие необходимо для индукции ответа Т-хелперных клеток [67]. Позднее это подтвердила другая группа исследователей: после пересадки DC от мышей с элиминацией NK-клеток, инфекция у мышей протекала хуже, при этом снижался уровень цитокинов IFNγ, IL-17, но наблюдался повышенный уровень IL-4, что свидетельствует о дисбалансе воспалительной реакции. Также описана роль NKG2D в этом взаимодействии: при его блокировании наблюдали изменение синтеза цитокинов [134].

Молекулярные механизмы взаимодействия NK-клеток и DC также не изучены до конца. Ранее показано, что мембранная фракция *Klebsiella pneumoniae* вызывает усиление синтеза DC хемокинов CXCL10, CCL19 и CCL5 (RANTES), а также вызывает миграцию NK-клеток, которая ингибировалась при блокировании CCR5 на поверхности NK-клеток [151]. В целом, взаимодействие NK-клеток и DC при бактериальных инфекциях служит связующим звеном для врожденного и адаптивного иммунитета, кроме того, в результате этого взаимодействия запускается синтез цитокинов, регулирующих иммунный ответ.

Кроме взаимодействия с DC при иммунном ответе на бактериальную инфекцию, в литературе описаны данные, свидетельствующие о роли контакта NK-клеток с макрофагами. Так показано, что NK-клетки, выделенные из фракции мононуклеаров периферической крови, усиливают экспрессию маркеров активации CD69 и CD25 в присутствии бактерий, а также увеличивают продукцию цитокинов IFNγ, IL-12, IL-10. В присутствии праймированных макрофагов секреция IFNγ NK-клетками возрастала по сравнению с культивированием в присутствии только бактерий [54].

В литературе встречаются данные о том, что NK-клетки участвуют в реализации процессов, лежащих в развитии сепсиса. На сегодняшний день роль NK-клеток в этом процессе оценивается неоднозначно. Показано, что у пациентов с худшим прогнозом выживаемости в периферической крови повышено содержание NK-клеток, экспрессирующих PD-1, — молекулы, ингибирующей активность клеток иммунной систе-

мы [66]. Вероятно, это свидетельствует о способности бактерий регулировать иммунный ответ.

В последние годы получены данные, свидетельствующие об участии NK-клеток в иммунном ответе против бактерий группы ESKAPE. В эксперименте у мышей, зараженных *A. baumannii* при истощении пула NK-клеток нарушался процесс миграции нейтрофилов в легкие, что приводило к снижению способности организма к элиминации бактерий [149]. Также есть данные, свидетельствующие о роли NK-клеток в иммунных реакциях при инфекциях, вызванных *S. aureus*: установлено, что при стафилокковой инфекции количество NK-клеток в очаге возрастало, при этом блокирование NK-клеток приводило к увеличению бактериальной нагрузки и снижению фагоцитирующей способности макрофагов, что может свидетельствовать о регуляторной роли NK-клеток при бактериальной инфекции [138].

Показано, что NK-клетки могут участвовать в защитных реакция при пневмонии, вызванной *K. pneumoniae*. Мыши, у которых NK-клетки были инактивированы при помощи антител, хуже справлялись с инфекцией, что выражалось в повышенном размножении бактерий в легких и увеличенной смертности особей в этой группе [164]. Авторы исследования предполагают, что роль NK-клеток в антибактериальном иммунитете может быть опосредована продукцией IL-22. На ранних этапах инфекции NK-клетки могут быть продуцентом этого цитокина, необходимого для усиления продукции бактерицидных белков [164, 171].

NK-клетки также могут быть задействованы в контроле развития пневмонии, вызванной *K. pneumoniae*, посредством взаимодействия с макрофагами. Благодаря выработке IFNγ NK-клетки вызывают усиление синтеза IL-12 макрофагами, а также стимулируют антибактериальные свойства клеток [64]. Установлено, что NK-клетки участвуют в элиминировании бактериальной пневмонии, вызванной *K. pneumoniae*. Они также изучили молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса. У мышей с вызванным дефицитом рецептора IFN I типа, NK-клетки вырабатывали меньше IFNγ, чем NK-клетки мышей дикого типа, что также сопровождалось ухудшением состояния животных. Кроме того, у таких мышей отмечена сниженная продукция IL-10, необходимого для рекрутирования NK-клеток. Также у мышей с дефицитом рецептора IFN I типа в легких отмечалось гораздо большее число бактерий. В целом, авторы приходят к выводу о том, что изменение рекрутирования и функций NK-клеток в отсутствии рецептора IFN I типа приводит к снижению активности макрофагов как главных участников антибактериального иммунитета [64].

NK-клетки могут участвовать в антибактериальном иммунитете посредством мембранных рецепторов, расположенных на их поверхности. При инфицировании *P. saeruginosa* NK-клетки вырабатывают IFNγ, однако при блокировании активирующего рецептора NKG2D отмечается снижение синтеза IFNγ NK-клетками, что свидетельствует об участии этого рецептора в иммунном ответе [158].

Некоторые исследователи описывают роль цитотоксических белков NK-клеток в поддержании антибактериального иммунитета. Так, при дефиците гранзимов у мышей пневмония, вызванная *P. aeruginosa*, протекала сходно с пневмонией у мышей дикого типа. Дефицит белков приводил лишь к временному росту бактериальной нагрузки в легких, а также усилению воспаления, но не влиял на выживаемость в группах [44]. Соответственно, цитотоксические белки NK-клеток могут играть лишь минорную роль в антибактериальном иммунитете. Однако в работе 2022 г. показано, что NK-клетки могут осуществлять цитотоксичность по отношению к клеткам *P. aeruginosa*, причем это происходит при контактном взаимодействии, с повреждением бактериальной мембраны. Однако при нарушении синтеза гранзимов B и H, происходило подавление цитотоксической функции NK-клеток по отношению к бактериям [85], что может указывать на необходимость этих белков в антибактериальном иммунном ответе.

На модели легочной инфекции, вызванной *S. aureus*, в 2008 г. было показано, что IL-15 также вносит вклад в антибактериальный иммунитет в связи с его влиянием на NK-клетки и макрофаги. Само культивирование NK-клеток в присутствии бактерий приводило к активации лимфоцитов врожденного иммунитета, однако у мышей, нокаутированных по IL-15, число активированных NK-клеток было ниже, животные оказались более восприимчивы к инфекции [138]. Авторы исследования связывают это со взаимодействием NK-клеток и макрофагов, поскольку NK-клетки могут регулировать их активность [172]. В данном исследовании показано, что в ответ на бактериальную инфекцию, усиливается синтез IL-15 это вызывает не только активацию NK-клеток, но и усиление фагоцитирующей способности макрофагов, что отменяется удалением NK-клеток из организма [138].

В табл. 3 представлены данные о возможном лиганд-рецепторном взаимодействии NK-клеток и бактерий группы ESKAPE.

Таким образом, NK-клетки, помимо участия в противовирусном и противоопухолевом иммунных ответах, играют важную роль в антибактериальной защите: как опосредованно, регулируя функции других клеток иммунной системы при помощи продукции цитокинов, так и напрямую.

## Бактерии группы ESKAPE как регуляторы взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта

NK-клетки встречаются не только в периферической крови. Описаны их локальные популяции в печени [121], жировой ткани [84], слюнных железах [28] и матке [70]. Последняя группа представляет особый интерес в связи с возможной ролью в регуляции репродуктивных процессов.

Во время беременности количество NK-клеток в матке возрастает до 70% от общего числа лейкоцитов органа [97], что говорит о возможном непосредственном участии клеток в развитии и поддержании беременности. NK-клетки участвуют в ремоделировании спираль-

**Таблица 3. Характеристика лиганд-рецепторного взаимодействия NK-клеток и бактерий группы ESKAPE**

Table 3. Characteristics of ligand-receptor interaction between NK cells and ESKAPE bacteria

| **Рецептор** Receptor | **Лиганд** Ligand | **Сигналлинг** Signaling pathway | **Лиганды, характерные для бактерий группы ESKAPE** ESKAPE bacteria-typical ligands | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Бактерия** Bacteria | **Лиганд** Ligand |
| **TLR1 [25]** | **Липопротеины, липоманнаны, липотейхоевая кислота (бактерии) [2], глюканы и зимозан (грибы) [2]** Lipoproteins, lipomannans, lipoteichoic acid (bacteria) [2], glucans and zymosan (fungi) [2] | **NF-κB [22, 58] JAK/STAT [22]** | **Нет данных** No data | |
| **TLR2 [20, 38]** | | **JAK/STAT [132]** | ***S. aureus*** | **Энтеротоксин Б [129]** Enterotoxin A [129] |
| | | | ***K. pneumoniae*** | **Флагеллин и белок внешней мембраны А [20]** Flagellin and outer membrane protein A [20] |
| **TLR3 [38]** | **Двуцепочечная РНК (вирусы) [2]** Double-stranded RNA (viruses) [2] | **NF-κB [132] JAK/STAT [132]** | – | |
| **TLR4 [38]** | **Липотейхоевая кислота, липополисахарид (бактерии)** Lipoteichoic acid, lipopolysaccharide (bacteria) | **MAPK/NF-κB [163]** | ***S. aureus*** | **Энтеротоксин О [61]** Enterotoxin O [61] |
| | | | ***A. baumannii*** | **Липополисахариды [69]** Lipopolysaccharides [69] |
| | | | ***Enterobacter* spp.** | **Порины внешней мемебраны [112]** Porins of the outer membrane [112] |
| **TLR5 [20, 25]** | **Флагеллин (бактерии)** Flagellin (bacteria) | **NF-κB [145]** | ***P. aeruginosa*** | **Флагеллин [20, 86]** Flagellin [20, 86] |
| | | | ***K. pneumoniae*** | |
| **TLR7 [6, 154]** | **Одноцепочечная РНК (вирусы)** Single-stranded RNA (viruses) | **NF-κB [56]** | – | |
| **TLR8 [6, 154]** | | **NF-κB [56]** | | |
| **TLR9 [15, 154]** | **ДНК с неметилированным CpG (бактерии)** DNA with unmethylated CpG (bacteria) | **NF-κB [160]** | **Нет данных** No data | |
| **NLRP3 [102]** | **Нет данных** No data | **NF-κB [51]** | ***S. aureus*** | **Энтеротоксин О [61]** Enterotoxin O [61] |
| **NOD1 [102]** | **Мурамилдипептид (бактерии)** Muramyldipeptide (bacteria) | **JNK/ NF-κB [45]** | **Нет данных** No data | |
| **NOD2 [101]** | **γ-глутамил-диаминопимелиновая кислота (бактерии)** γ-glutamyl-diaminopimelic acid (bacteria) | **NF-κB [166]** | ***E. faecium*** | **Антиген А (секретируемая пептидогликан-гидролаза) [76]** Antigen A (secreted peptidoglycan hydrolase) [76] |

ных артерий, подготавливая матку к беременности, также NK-клетки активно синтезируют цитокины, регулирующие инвазию и миграцию плода. Наиболее активно изучают их взаимодействие с клетками трофобласта. Показано, что клетки взаимно регулируют характеристики друг друга как за счет контактных, так и дистантных взаимодействий, обеспечивая формирование оптимального микроокружения для развивающегося плода [104, 162].

На сегодняшний день считают, что взаимодействие между NK-клетками и клетками трофобласта — ключевое звено в наступлении и развитии беременности, нарушение которого приводит к репродуктивным патологиям. Причем взаимодействие может быть нарушено и изменением числа NK-клеток [4], и усилением [46] либо ингибированием их цитотоксической активности [170], и изменением спектра цитокинов [41].

Оба типа клеток посредством дистантных и контактных взаимодействий регулируют функции друг друга, формируя оптимальное микроокружение для развивающегося плода.

Вероятно, бактерии группы ESKAPE могут нарушать этот процесс, о чем косвенно свидетельствуют обнаружение представителей группы при патологиях репродуктивной функции. Дисбактериозы половой системы матери считаются фактором, увеличивающим риски потери беременности [35, 113]. Лечение таких дисбактериозов осложняется, в том числе по причине антибитикоустойчивости штаммов бактерий группы ESKAPE [11]. Аэробные вагиниты, вызываемые *S. aureus*, *E. faecalis*, могут быть причиной воспалительных процессов в течение беременности, что негативно сказывается на развитии плода [55]. Установлено, что у женщин с репродуктивными патологиями в эндометрии обнаруживаются мультирезистентные *E. faecalis*, *P. aeruginosa* [32]. Также показано, что повышенное число NK-клеток в периферической крови и колонизация влагалища грамотрицательными анаэробами, в том числе *Enterobacter* spp. и *Klebsiella* spp., ассоциировано с повторяющимися выкидышами [80]. В проведенном ретроспективном исследовании 2019 г. установлено, что инфекции половых путей (в том числе воспаление слизистой оболочки матки — эндометрит), вызванные некоторыми бактериями группы ESKAPE, ассоциированы с репродуктивными патологиями: 74% процента женщин с инфекциями половых путей в анамнезе имели потери плода на раннем сроке [130]. Также установлено, что у женщин с повторными выкидышами в составе микробиома эндометрия преобладают бактерии *Acinetobacter* spp. [89].

Ниже рассмотрим возможные механизмы участия бактерий группы ESKAPE в развитии репродуктивных патологий, вызванных нарушением взаимодействия NK-клеток и клеток трофобласта.

Установлено, что инфицирование *P. aeruginosa* приводит к стимулированию апоптоза NK-клеток по каспаза-9-зависимому механизму [23], имеются данные о влиянии продуцируемых *P. aeruginosa* эластазы и щелочной протеазы на активность NK-клеток; вероятно, эти факторы вызывают нарушение структуры рецепторов NK-клеток, участвующих в связывании мишени [120], что может приводить к нарушению цитотоксического воздействия на клетки-мишени. При этом цитотоксическая активность NK-клеток матки является важным фактором развития беременности. Несмотря на то что децидуальные NK-клетки содержат гранулы и экспрессируют лизирующие молекулы, они не обладают ярко выраженной цитотоксической активностью, проявляя лишь 15% литической активности NK-клеток периферической крови [3, 78], что указывает на необходимость изменения их функций под действием факторов микроокружения в области контакта мать–плод. При репродуктивных патологиях часто наблюдается измененный баланс цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток плодного происхождения, в том числе клеток трофобласта. В некоторых исследованиях привычную потерю беременности связывают с избыточной цитотоксической активностью NK-клеток. Так, в 2014 г. установлено, что у женщин с преобладающей популяцией цитотоксических, но не регуляторных NK-клеток матки, повышен риск бесплодия [46]. Показано также, что в случае выкидыша клеткам трофобласта свойственна сниженная способность к аутофагии, что приводит к усилению цитотоксических свойств NK-клеток [147]. Сами клетки трофобласта как посредством дистантных [156], так и контактных взаимодействий [143] могут снижать цитотоксическую активность NK-клеток. При этом некоторые исследователи, напротив, указывают сниженную цитотоксическую активность NK-клеток в качестве причины повторяющихся выкидышей [170]. Соответственно, бактерии группы ESKAPE, влияя на NK-клетки, могут изменять их цитотоксический потенциал в отношении клеток трофобласта, что приводит к нарушению репродуктивной функции.

Показано, что культивирование фракции мононуклеаров, содержащей NK-клетки, в присутствии биопленок *P. aeruginosa* привело к повышению содержания IFNγ и TNFα [73]. В эксперименте с мышами было установлено повышение количества NK-клеток, секретирующих IFNγ, в ответ на инфицирование животных *P. aeruginosa* [158]. В то же время установлен

и противоположный эффект белка, секретируемого *P. aeruginosa,* — экзотоксина А. Полагают, что белок также может выступать регулятором функции клеток иммунной системы, снижая продукцию IFNγ NK-клетками и их цитотоксическую активность в составе PBMC (periferal blood mononuclear cell). Кроме того, белок вызвал снижение цитотоксической активности NK-клеток [103]. При этом отмечено увеличение продукции IFNγ NK-клетками периферической крови при культивировании в присутствии гемолизина — белка, синтезируемого *S. aureus* [52]. Культивирование PBMC в присутствии биопленок *P. aeruginosa* также приводило к изменению секреции цитокинов: так, отмечено повышение уровня секреции IL-1β, IFNγ, IL-10, IL-6 и TNFα [73]. В другом исследовании отмечен рост продукции TNFα, IL-6, IL-10 мононуклеарами периферической крови в присутствии клеточной стенки *E. faecalis* [140]. Цитокиновое микроокружение играет важную роль при взаимодействии NK-клеток и клеток трофобласта. Цитотоксическая функция NK-клеток также регулируется продуцируемыми ими цитокинами IFNγ и TNFα [157]. Кроме того, IFNγ оказывает ингибирующее воздействие на клетки трофобласта, снижая способность к инвазии, что может быть вызвано сниженной продукцией MMP-2 (матриксных металлопротеаз) — ферментов, участвующих в разрушении компонентов внеклеточного матрикса. Цитокин индуцирует апоптоз клеток трофобласта [82]. Соответственно, перестройка продукции IFNγ NK-клетками может приводить не только к изменению их функций, но и оказывать влияние на клетки плодного происхождения. Сходный эффект обнаружен для TNFα: описано, что цитокин самостоятельно и в сочетании с IFNγ снижает способность клеток трофобласта к инвазии, индуцируя их апоптоз и снижение пролиферативной активности [116]. В литературе встречаются данные о том, что цитокин TGFβ, секретируемый клетками трофобласта [49], снижает выработку NK-клетками IFNγ [168], что, вероятно, может служить для создания безопасного для клеток трофобласта микроокружения. IL-1β участвует в модулировании инвазивной и миграционной способностей клеток трофобласта [87, 125], IL-6 и IL-10 также усиливают цитотоксические свойства NK-клеток [16, 94]. Таким образом, бактерии группы ESKAPE могут нарушать равновесие в системе мать—плод, изменяя продукцию цитокинов клетками микроокружения, в том числе NK-клетками.

Бактерии группы ESKAPE могут оказывать влияние и на экспрессию NK-клетками поверхностных рецепторов. При культивировании NK-клеток в составе мононуклеаров периферической крови в присутствии биопленки, сформированной *P. aeruginosa*, экспрессия CD69 возрастала [73], что свидетельствует об активации лимфоцитов. Некоторые исследователи указывают на количе-

**Таблица 4. Влияние бактерий группы ESKAPE на характеристики NK-клеток**
Table 4. Effect of ESKAPE bacteria on NK cell parameters

| **Представитель группы ESKAPE** Member of ESKAPE group | **Эффект на NK-клетки** Effect on NK cells | | |
|---|---|---|---|
| | **Фенотип** Phenotype | **Продукция цитокинов** Cytokine production | **Функция** Function |
| ***E.faecium*** | **Нет данных** No data | **Нет данных** No data | **Нет данных** No data |
| ***S. aureus*** | **Нет данных** No data | **Увеличение продукции IFNγ [52]** Increased IFNγ production [52] | **Нет данных** No data |
| ***K. pneumoniae*** | **Рецептор NKG2D задействован в элиминации патогена [158]** NKG2D receptor is involved in pathogen elimination [158] | **Нет данных** No data | **Продукция дефензинов [20]** Defensin production [20] |
| ***A.baumannii*** | **Нет данных** No data | | |
| ***P.aeruginosa*** | **Усиление экспрессии CD69 [73]** Enhancement of CD69 expression [73] | **Усиление синтеза IL-1β, IFNγ, IL-10, IL-6 и TNFα [73] или снижение синтеза IFNγ [103]** Enhanced synthesis of IL-1β, IFNγ, IL-10, IL-6 and TNFα [73] reduction of IFNγ synthesis [103] | **Индукция апоптоза NK-клеток [23], нарушение рецепторного взаимодействия [120]** Induction of NK cell apoptosis [23], altered receptor interaction [120] |
| ***Enterobacter* spp.** | **Нет данных** No data | | |

ство NK-клеток периферической крови, экспрессирующих CD69, как на предиктор репродуктивных патологий: показано, что у женщин с выкидышем после участия в программе вспомогательных репродуктивных технологий число $CD69^+$ NK-клеток было значительно ниже или выше, относительно женщин без репродуктивных потерь [33]. Установлено, что секретируемые плацентой факторы также ингибируют цитотоксичность NK-клеток посредством снижением числа $CD69^+$ NK-клеток [128]. Влияя на фенотип NK-клеток бактерии группы ESKAPE могут нарушать их взаимодействие с клетками трофобласта. В табл. 4 приведены данные о влиянии бактерий группы ESKAPE на характеристики NK-клеток.

## Заключение

Суммируя рассмотренные данные, отметим, что на сегодняшний день роль NK-клеток в антибактериальном иммунитете изучена недостаточно. Однако имеющиеся данные позволяют предположить, что NK-клетки вносят большой вклад в этот процесс. Кроме того, NK-клетки являются важными регуляторами развития беременности за счет взаимодействия с клетками трофобласта. Бактерии группы ESKAPE могут нарушать это взаимодействие, усиливая или ингибируя цитотоксические функции NK-клеток, а также меняя их цитокиновый профиль, что, в свою очередь, нарушает процессы пролиферации и инвазии клеток трофобласта. Раскрытие молекулярных механизмов этих явлений является актуальной задачей современной науки и необходимо как для предупреждения развития репродуктивных неудач, так и для регуляции функций NK-клеток при ряде других патологий. Имеющиеся представления о результатах взаимодействия NK-клеток и бактерий группы ESKAPE носят неоднозначный характер и требуют дальнейшего изучения.

## Список литературы/References


1. Малышкина Д.А., Анциферова Ю.С., Долгушина Н.В. Особенности экспрессии рецепторов семейства NCR в популяции эндометриальных естественных киллеров у пациенток с лейомиомой матки // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 22, № 2-1. С. 391–393. [Malyshkina D.A., Antsiferova Yu.S., Dolgushina N.V. The expresiion of NCR receptors by endometrial natural killers in women with uterine leiomyoma. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2019, vol. 22, no. 2-1, pp. 391–393. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006907-2*
2. Мерфи К., Уивер К. Иммунобиология по Джанвэю. М.: Логосфера, 2020. 1184 с. [Murphy K., Weaver K. Immunobiology by Janway. *Moscow: Logosphere, 2020. 1184 p. (In Russ.)*]
3. Abbas Y., Oefner C.M., Polacheck W.J., Gardner L., Farrell L., Sharkey A., Kamm R., Moffett A., Oyen M.L. A microfluidics assay to study invasion of human placental trophoblast cells. *J. R. Soc. Interface, 2017, vol. 14, no. 130: 20170131. doi: 10.1098/rsif.2017.0131*
4. Ahmadi M., Ghaebi M., Abdolmohammadi-Vahid S., Abbaspour-Aghdam S., Hamdi K., Abdollahi-Fard S., Danaii S., Mosapour P., Koushaeian L., Dolati S., Rikhtegar R., Oskouei F.D., Aghebati-Maleki L., Nouri M., Yousefi M. NK cell frequency and cytotoxicity in correlation to pregnancy outcome and response to IVIG therapy among women with recurrent pregnancy loss. *J. Cell. Physiol., 2018, vol. 234, no. 6, pp. 9428–9437. doi: 10.1002/jcp.27627*
5. Andersson M., Gunne H., Agerberth B., Boman A., Bergman T., Sillard R., Jörnvall H., Mutt V., Olsson B., Wigzell H. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J., 1995, vol. 14, no. 8, pp. 1615–1625. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07150.x*
6. Ao X., Gan Q., Huang X., Bao D., Wu X., Lin Q., Lin A., Ding Y., Wang L., Chen Y., Huang Z. TLR8 agonist partially improves IFNγ deficiency of NK cells in chronic hepatitis B through the synergy of monocytes. *Aliment. Pharmacol. Ther., 2022, vol. 57, no. 4, pp. 387–398. doi: 10.1111/apt.17382*
7. Augusto L.A., Bourgeois-Nicolaos N., Breton A., Barreault S., Alonso E.H., Gera S., Faraut-Derouin V., Semaan N., De Luca D., Chaby R., Doucet-Populaire F., Tissières P. Presence of 2-hydroxymyristate on endotoxins is associated with death in neonates with Enterobacter cloacae complex septic shock. *iScience, 2021, vol. 24, no. 8: 102916. doi: 10.1016/j.isci.2021.102916*
8. Avendaño-Ortiz J., Llanos-González E., Toledano V., del Campo R., Cubillos-Zapata C., Lozano-Rodríguez R., Ismail A., Prados C., Gómez-Campelo P., Aguirre L.A., García-Río F., López-Collazo E. Pseudomonas aeruginosa colonization causes PD-L1 overexpression on monocytes, impairing the adaptive immune response in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros., 2019, vol. 18, no. 5, pp. 630–635. doi: 10.1016/j.jcf.2018.11.002*
9. Ayobami O., Willrich N., Reuss A., Eckmanns T., Markwart R. The ongoing challenge of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerg. Microbes Infect., 2020, vol. 9, no. 1, pp. 1180–1193. doi: 10.1080/22221751.2020.1769500*
10. Bae J.S., Da F., Liu R., He L., Lv H., Fisher E.L., Rajagopalan G., Li M., Cheung G.Y.C., Otto M. Contribution of Staphylococcal enterotoxin B to Staphylococcus aureus systemic infection. *J. Infect. Dis., 2021, vol. 223, no. 10, pp. 1766–1775. doi: 10.1093/infdis/jiaa584*
11. Balle C., Esra R., Havyarimana E., Jaumdally S.Z., Lennard K., Konstantinus I.N., Barnabas S.L., Happel A.U., Gill K., Pidwell T., Lingappa J.R., Gamieldien H., Bekker L.G., Passmore J.S., Jaspan H.B. Relationship between the oral and vaginal microbiota of South African adolescents with high prevalence of bacterial vaginosis. *Microorganisms, 2020, vol. 8, no. 7: 1004. doi: 10.3390/microorganisms8071004*
12. Bengoechea J.A., Sa Pessoa J. Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Rev., 2019, vol. 43, no. 2, pp. 123–144. doi: 10.1093/femsre/fuy043*

13. Bernardy E.E., Petit R.A., Raghuram V., Alexander A.M., Read T.D., Goldberg J.B., Harwood C.S. Genotypic and phenotypic diversity of Staphylococcus aureus isolates from cystic fibrosis patient lung infections and their interactions with Pseudomonas aeruginosa. *mBio, 2020, vol. 11, no. 3: e00735-20. doi: 10.1128/mBio.00735-20*
14. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis., 2009, vol. 48, no. 1, pp. 1–12. doi: 10.1086/595011*
15. Brennan T.V., Lin L., Brandstadter J.D., Rendell V.R., Dredge K., Huang X., Yang Y. Heparan sulfate mimetic PG545-mediated antilymphoma effects require TLR9-dependent NK cell activation. *J. Clin. Invest., 2016, vol. 126, no. 1, pp. 207–219. doi: 10.1172/JCI76566*
16. Cai G., Kastelein R.A., Hunter C.A. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur. J. Immunol., 1999, vol. 29, no. 9, pp. 2658–2665. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2658::AID-IMMU2658>3.0.CO;2-G*
17. Cai S., Wang J., Wang K., Chen D., Dong X., Liu T., Zeng Y., Wang X., Wu D. Expression, purification and antibacterial activity of NK-lysin mature peptides from the channel catfish (Ictalurus punctatus). *Appl. Sci., 2016, vol. 6, no. 9: 240. doi: 10.3390/app6090240*
18. Caneiras C., Lito L., Melo-Cristino J., Duarte A. Community- and hospital-acquired Klebsiella pneumoniae urinary tract infections in portugal: virulence and antibiotic resistance. *Microorganisms, 2019, vol. 7, no. 5: 138. doi: 10.3390/microorganisms7050138*
19. Cavalcanti Y.V.N., Brelaz M.C.A., Lemoine Neves J.K.d.A., Ferraz J.C., Pereira V.R.A. Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. *Pulm. Med., 2012, vol. 2012: 745483. doi: 10.1155/2012/745483*
20. Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J.F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., Delneste Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood, 2004, vol. 104, no. 6, pp. 1778–1783. doi: 10.1182/blood-2003-08-2820*
21. Chambers H.F. The changing epidemiology of Staphylococcus aureus? *Emerg. Infect. Dis., 2001, vol. 7, no. 2, pp. 178–182. doi: 10.3201/eid0702.010204*
22. Chen L., Yi L., Ren Y., Zhang J., Kinghorn A.D., Caligiuri M.A., Yu J. Enhancement of natural killer cell interferon-gamma production by the derivatives of the natural product phyllanthusmins via TLR-mediated NF-kb and STAT3 signaling pathways. *Blood, 2015, vol. 126, no. 23, pp. 1031–1031. doi: 10.1182/blood.V126.23.1031.1031*
23. Chung J.W., Piao Z.H., Yoon S.R., Kim M.S., Jeong M., Lee S.H., Min J.K., Kim J.W., Cho Y.H., Kim J.C., Ahn J.K., Kim K.E., Choi I. Pseudomonas aeruginosa eliminates natural killer cells via phagocytosis-induced apoptosis. *PLoS Pathog., 2009, vol. 5, no. 8: e1000561. doi: 10.1371/journal.ppat.1000561*
24. Cimpean M., Cooper M.A. Metabolic regulation of NK cell antiviral functions during cytomegalovirus infection. *J. Leuk. Biol., 2023, vol. 113, no. 5, pp. 525–534. doi: 10.1093/jleuko/qiad018*
25. Comin F., Speziali E., Martins-Filho O.A., Caldas I.R., Moura V., Gazzinelli A., Correa-Oliveira R., Faria A.M.C. Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis. *Clin. Exp. Immunol., 2007, vol. 149, no. 2, pp. 274–284. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03403.x*
26. Cong Y., Yang S., Rao X. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: a review of case updating and clinical features. *J. Adv. Res., 2020, vol. 21, pp. 169–176. doi: 10.1016/j.jare.2019.10.005*
27. Coombs G.W., Daley D.A., Thin Lee Y., Pang S., Pearson J.C., Robinson J.O., Johnson P.D., Kotsanas D., Bell J.M., Turnidge J.D., Australian Group on Antimicrobial R. Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Enterococcal Sepsis Outcome Programme annual report, 2014. *Commun. Dis. Intell. Q Rep., 2016, vol. 40, no. 2, pp. E236–E243.*
28. Cortez V.S., Fuchs A., Cella M., Gilfillan S., Colonna M. Cutting edge: salivary gland NK cells develop independently of Nfil3 in steady-state. *J. Immunol., 2014, vol. 192, no. 10, pp. 4487–4491. doi: 10.4049/jimmunol.1303469*
29. Dadashi M., Hajikhani B., Darban-Sarokhalil D., van Belkum A., Goudarzi M. Mupirocin resistance in Staphylococcus aureus: a systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Antimicrob. Resist., 2020, vol. 20, pp. 238–247. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.032*
30. Davin-Regli A., Lavigne J.P., Pages J.M. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev., 2019, vol. 32, no. 4: e00002-19. doi: 10.1128/CMR.00002-19*
31. De Oliveira D.M.P., Forde B.M., Phan M.-D., Steiner B., Zhang B., Zuegg J., El-deeb I.M., Li G., Keller N., Brouwer S., Harbison-Price N., Cork A.J., Bauer M.J., Alquethamy S.F., Beatson S.A., Roberts J.A., Paterson D.L., McEwan A.G., Blaskovich M.A.T., Schembri M.A., McDevitt C.A., von Itzstein M., Walker M.J., Ballard J.D. Rescuing tetracycline class antibiotics for the treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii pulmonary infection. *mBio, 2022, vol. 13, no. 1: e0351721. doi: 10.1128/mbio.03517-21*
32. Devi C.A., Ranjani A., Dhanasekaran D., Thajuddin N., Ramanidevi T. Surveillance of multidrug resistant bacteria pathogens from female infertility cases. *Afr. J. Biotechnol., 2013, vol. 12, no. 26, pp. 4129–4134. doi: 10.5897/AJB2013.12507*
33. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Sirenko V.Y., Strelko G.V., Osypchuk D.V. Peripheral blood natural killer cells activation status determined by CD69 upregulation predicts implantation outcome in IVF. *Immunobiology, 2014, vol. 219, no. 3, pp. 167–171. doi: 10.1016/j.imbio.2013.09.002*
34. Ebbo M., Gérard L., Carpentier S., Vély F., Cypowyj S., Farnarier C., Vince N., Malphettes M., Fieschi C., Oksenhendler E., Schleinitz N., Vivier E. Low circulating natural killer cell counts are associated with severe disease in patients with common variable immunodeficiency. *EBioMedicine, 2016, vol. 6, pp. 222–230. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.025*
35. Eckert L.O., Moore D.E., Patton D.L., Agnew K.J., Eschenbach D.A. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2003, vol. 11, no. 1, pp. 11–17. doi: 10.1155/S1064744903000024*
36. El Zowalaty M.E., Al Thani A.A., Webster T.J., El Zowalaty A.E., Schweizer H.P., Nasrallah G.K., Marei H.E., Ashour H.M. Pseudomonas aeruginosa: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol., 2015, vol. 10, no. 10, pp. 1683–706. doi: 10.2217/fmb.15.48*
37. Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2002, vol. 99, no. 11, pp. 7687–7692. doi: 10.1073/pnas.122108599*

38. Eriksson M., Meadows S.K., Basu S., Mselle T.F., Wira C.R., Sentman C.L. TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. *J. Immunol., 2006, vol. 176, no. 10, pp. 6219–6224. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6219*
39. Feasey N.A., Garner P., Hamer D.H., Dramowski A., van Ginneken N., Musicha P., Lester R. Prevalence and outcome of bloodstream infections due to third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in sub-Saharan Africa: a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother., 2020, vol. 75, no. 3, pp. 492–507. doi: 10.1093/jac/dkz464*
40. Fu Q., Maniar A., Quevedo Diaz M., Chapoval A.I., Medvedev A.E. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immunity, 2010, vol. 17, no. 4, pp. 375–387. doi: 10.1177/1753425910372000*
41. Fukui A., Funamizu A., Fukuhara R., Shibahara H. Expression of natural cytotoxicity receptors and cytokine production on endometrial natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss or implantation failure, and the expression of natural cytotoxicity receptors on peripheral blood natural killer cells in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss. *J. Obstet. Gynaecol. Res., 2017, vol. 43, no. 11, pp. 1678–1686. doi: 10.1111/jog.13448*
42. Gan L., Yan C., Cui J., Xue G., Fu H., Du B., Zhao H., Feng J., Feng Y., Fan Z., Mao P., Fu T., Xu Z., Du S., Liu S., Zhang R., Zhang Q., Li N., Cui X., Li X., Zhou Y., Huang L., Yuan J., Teo J.W.P. Genetic diversity and pathogenic features in Klebsiella pneumoniae isolates from patients with pyogenic liver abscess and pneumonia. *Microbiol. Spectr., 2022, vol. 10, no. 2: e0264621. doi: 10.1128/spectrum.02646-21*
43. Gao W., Howden B.P., Stinear T.P. Evolution of virulence in Enterococcus faecium, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr. Opin. Microbiol., 2018, vol. 41, pp. 76–82. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.030*
44. García-Laorden M.I., Stroo I., Blok D.C., Florquin S., Medema J.P., de Vos A.F., van der Poll T. Granzymes A and B regulate the local inflammatory response during Klebsiella pneumoniae pneumonia. *J. Innate Immun., 2016, vol. 8, no. 3, pp. 258–268. doi: 10.1159/000443401*
45. Girardin S.E., Tournebize R., Mavris M., Page A.L., Li X., Stark G.R., Bertin J., DiStefano P.S., Yaniv M., Sansonetti P.J., Philpott D.J. CARD4/Nod1 mediates NF-κB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. *EMBO Rep., 2001, vol. 2, no. 8, pp. 736–742. doi: 10.1093/embo-reports/kve155*
46. Giuliani E., Parkin K.L., Lessey B.A., Young S.L., Fazleabas A.T. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol., 2014, vol. 72, no. 3, pp. 262–269. doi: 10.1111/aji.12259*
47. Goldenson B.H., Zhu H., Wang Y.M., Heragu N., Bernareggi D., Ruiz-Cisneros A., Bahena A., Ask E.H., Hoel H.J., Malmberg K.-J., Kaufman D.S. Umbilical cord blood and iPSC-derived natural killer cells demonstrate key differences in cytotoxic activity and KIR profiles. *Front. Immunol., 2020, vol. 11, no. doi: 10.3389/fimmu.2020.561553*
48. Gorrie C., Higgs C., Carter G., Stinear T.P., Howden B. Genomics of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Microb. Genom., 2019, vol. 5, no. 7: e000283. doi: 10.1099/mgen.0.000283*
49. Graham C.H., Lysiak J.J., McCrae K.R., Lala P.K. Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod., 1992, vol. 46, no. 4, pp. 561–572. doi: 10.1095/biolreprod46.4.561*
50. Grebenkina P.V., Mikhailova V.A., Oshkolova A.A., Vershinina S.O., Dukhinova M.S., Bazhenov D.O., Selkov S.A., Sokolov D.I. Decidual natural killer cells and trophoblast cells: cellular, humoral and molecular mechanisms of interaction. *Medical Immunology (Russia), 2022, vol. 24, no. 6, pp. 1085–1108. doi: 10.15789/1563-0625-dnk-2540*
51. Groslambert M., Py B. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J. Inflam. Res., 2018, vol. 11, pp. 359–374. doi: 10.2147/jir.S141220*
52. Guan Z., Liu Y., Liu C., Wang H., Feng J., Yang G. Staphylococcus aureus β-hemolysin up-regulates the expression of IFN-γ by human CD56bright NK cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2021, vol. 11 : 658141. doi: 10.3389/fcimb.2021.658141*
53. Halabian R., Jahangiri A., Sedighian H., Behzadi E., Fooladi A.A.I. Staphylococcal enterotoxin B as DNA vaccine against breast cancer in a murine model. *Int. Microbiol., 2023: pp. 1–11. doi: 10.1007/s10123-023-00348-y*
54. Haller D., Clements J.D., Blum S., Bode C., Hammes W.P., Schiffrin E.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect. Immun., 2000, vol. 68, no. 2, pp. 752–759. doi: 10.1128/iai.68.2.752-759.2000*
55. Han C., Li H., Han L., Wang C., Yan Y., Qi W., Fan A., Wang Y., Xue F. Aerobic vaginitis in late pregnancy and outcomes of pregnancy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2019, vol. 38, no. 2, pp. 233–239. doi: 10.1007/s10096-018-3416-2*
56. Hart O.M., Athie-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-γ production. *J. Immunol., 2005, vol. 175, no. 3, pp. 1636–1642. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1636*
57. Hayakawa Y., Screpanti V., Yagita H., Grandien A., Ljunggren H.-G., Smyth M.J., Chambers B.J. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J. Immunol., 2004, vol. 172, no. 1, pp. 123–129. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.123*
58. He S., Chu J., Wu L.-C., Mao H., Peng Y., Alvarez-Breckenridge C.A., Hughes T., Wei M., Zhang J., Yuan S., Sandhu S., Vasu S., Benson D.M., C. Hofmeister C., He X., Ghoshal K., Devine S.M., Caligiuri M.A., Yu J. MicroRNAs activate natural killer cells through Toll-like receptor signaling. *Blood, 2013, vol. 121, no. 23, pp. 4663–4671. doi: 10.1182/blood-2012-07-441360*
59. He T., Tang C., Xu S., Moyana T., Xiang J. Interferon gamma stimulates cellular maturation of dendritic cell line DC2.4 leading to induction of efficient cytotoxic T cell responses and antitumor immunity. *Cell. Mol. Immunol., 2007, vol. 4, no. 2, pp. 105–111.*
60. Hoffmann S.C., Cohnen A., Ludwig T., Watzl C. 2B4 engagement mediates rapid LFA-1 and actin-dependent NK cell adhesion to tumor cells as measured by single cell force spectroscopy. *J. Immunol., 2011, vol. 186, no. 5, pp. 2757–2764. doi: 10.4049/jimmunol.1002867*
61. Hou F., Peng L., Jiang J., Chen T., Xu D., Huang Q., Ye C., Peng Y., Hu D.-L., Fang R. ATP facilitates ыtaphylococcal enterotoxin O шnduced neutrophil IL-1β secretion via NLRP3 inflammasome dependent pathways. *Front. Immunol., 2021, vol. 12: 649235. doi: 10.3389/fimmu.2021.649235*
62. Huang Y., Rana A.P., Wenzler E., Ozer E.A., Krapp F., Bulitta J.B., Hauser A.R., Bulman Z.P. Aminoglycoside-resistance gene signatures are predictive of aminoglycoside MICs for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. *J. Antimicrob. Chemother., 2022, vol. 77, no. 2, pp. 356–363. doi: 10.1093/jac/dkab381*

63. Huebner J., Fischetti V.A., Wang Y., Krueger W.A., Madoff L.C., Martirosian G., Boisot S., Goldmann D.A., Kasper D.L., Tzianabos A.O., Pier G.B. isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of Enterococcus faecalis and vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Infect. Immun., 1999, vol. 67, no. 3, pp. 1213–1219. doi: 10.1128/iai.67.3.1213-1219.1999*
64. Ivin M., Dumigan A., de Vasconcelos F.N., Ebner F., Borroni M., Kavirayani A., Przybyszewska K.N., Ingram R.J., Lienenklaus S., Kalinke U., Stoiber D., Bengoechea J.A., Kovarik P. Natural killer cell-intrinsic type I IFN signaling controls Klebsiella pneumoniae growth during lung infection. *PLoS Pathog., 2017, vol. 13, no. 11: e1006696. doi: 10.1371/journal.ppat.1006696*
65. Jabbari Shiadeh S.M., Pormohammad A., Hashemi A., Lak P. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Drug. Resist., 2019, vol. 12, pp. 2713–2725. doi: 10.2147/IDR.S206084*
66. Jiang W., Li X., Wen M., Liu X., Wang K., Wang Q., Li Y., Zhou M., Liu M., Hu B., Zeng H. Increased percentage of PD-L1+ natural killer cells predicts poor prognosis in sepsis patients: a prospective observational cohort study. *Crit. Care, 2020, vol. 24, no. 1: 617. doi: 10.1186/s13054-020-03329-z*
67. Jiao L., Gao X., Joyee A.G., Zhao L., Qiu H., Yang M., Fan Y., Wang S., Yang X. NK cells promote type 1 T cell immunity through modulating the function of dendritic cells during intracellular bacterial infection. *J. Immunol., 2011, vol. 187, no. 1, pp. 401–411. doi: 10.4049/jimmunol.1002519*
68. Joji R., Al Rashed N., Saeed N., Bindayna K. Detection of overexpression of efflux pump expression in fluoroquinolone-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates. *Int. J. Appl. Basic. Med. Res., 2020, vol. 10, no. 1, pp. 37-42. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_90_19*
69. Kamoshida G., Akaji T., Takemoto N., Suzuki Y., Sato Y., Kai D., Hibino T., Yamaguchi D., Kikuchi-Ueda T., Nishida S., Unno Y., Tansho-Nagakawa S., Ubagai T., Miyoshi-Akiyama T., Oda M., Ono Y. Lipopolysaccharide-deficient Acinetobacter baumannii due to colistin resistance is killed by neutrophil-produced lysozyme. *Front. Microbiol., 2020, vol. 11, no. doi: 10.3389/fmicb.2020.00573*
70. Kanter J., Gordon S.M., Mani S., Sokalska A., Park J.Y., Senapati S., Huh D.D., Mainigi M. Hormonal stimulation reduces numbers and impairs function of human uterine natural killer cells during implantation. *Hum Reprod., 2023, vol. 38, no. 6, pp. 1047–1059. doi: 10.1093/humrep/dead069*
71. Khalifa S.M., Abd El-Aziz A.M., Hassan R., Abdelmegeed E.S. β-lactam resistance associated with β-lactamase production and porin alteration in clinical isolates of E. coli and K. pneumoniae. *PLoS One, 2021, vol. 16, no.5: e0251594. doi: 10.1371/journal.pone.0251594*
72. Kathirvel S., Mani M., Gopala Krishnan G.K., Sethumadhavan A., Vijayalakshmi T., Ponnan S.M., Hanna L.E., Mathaiyan M. Molecular characterization of Enterococcus faecalis isolates from urinary tract infection and interaction between Enterococcus faecalis encountered Dendritic and Natural Killer cells. *Microb. Pathog., 2020, vol. 140: 103944. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103944*
73. Kaya E., Grassi L., Benedetti A., Maisetta G., Pileggi C., Di Luca M., Batoni G., Esin S. In vitro interaction of Pseudomonas aeruginosa biofilms with human peripheral blood mononuclear cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2020, vol. 10: 187. doi: 10.3389/fcimb.2020.00187*
74. Khalili Y., Yekani M., Goli H.R., Memar M.Y. Characterization of carbapenem-resistant but cephalosporin-susceptible Pseudomonas aeruginosa. *Acta Microbiol Immunol Hung., 2019, vol. 66, no. 4, pp. 529–540. doi: 10.1556/030.66.2019.036*
75. Khanmohammadi S., Rezaei N. CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy in lymphoma. *Expert Opin. Biol. Ther., 2022, vol. 23, no. 1, pp. 37–47. doi: 10.1080/14712598.2022.2154601*
76. Kim B., Wang Y.-C., Hespen C.W., Espinosa J., Salje J., Rangan K.J., Oren D.A., Kang J.Y., Pedicord V.A., Hang H.C. Enterococcus faecium secreted antigen A generates muropeptides to enhance host immunity and limit bacterial pathogenesis. *eLife, 2019, vol. 8: e45343. doi: 10.7554/eLife.45343*
77. Klimpel G.R., Niesel D.W., Klimpel K.D. Natural cytotoxic effector cell activity against Shigella flexneri-infected HeLa cells. *J. Immunol., 1986, vol. 136, no. 3, pp. 1081–1086.*
78. Kopcow H.D., Allan D.S., Chen X., Rybalov B., Andzelm M.M., Ge B., Strominger J.L. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2005, vol. 102, no. 43, pp. 15563–15568.*
79. Korenevsky A.V., Shcherbitskaia A.D., Berezkina M.E., Markova K.L., Alexandrova E.P., Balabas O.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. MALDI-TOF mass spectrometric protein profiling of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line. *Medical Immunology (Russia), 2020, vol. 22, no. 4, pp. 633–646. doi: 10.15789/1563-0625-MMS-1976*
80. Kuon R.J., Togawa R., Vomstein K., Weber M., Goeggl T., Strowitzki T., Markert U.R., Zimmermann S., Daniel V., Dalpke A.H., Toth B. Higher prevalence of colonization with Gardnerella vaginalis and gram-negative anaerobes in patients with recurrent miscarriage and elevated peripheral natural killer cells. *J. Reproduct. Immunol., 2017, vol. 120, pp. 15–19. doi: 10.1016/j.jri.2017.03.001*
81. Kussmann M., Karer M., Obermueller M., Schmidt K., Barousch W., Moser D., Nehr M., Ramharter M., Poeppl W., Makristathis A., Winkler S., Thalhammer F., Burgmann H., Lagler H. Emergence of a dalbavancin induced glycopeptide/lipoglycopeptide non-susceptible Staphylococcus aureus during treatment of a cardiac device-related endocarditis. *Emerg. Microbes. Infect., 2018, vol. 7, no. 1: 202. doi: 10.1038/s41426-018-0205-z*
82. Lash G.E., Otun H.A., Innes B.A., Kirkley M., De Oliveira L., Searle R.F., Robson S.C., Bulmer J.N. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB J., 2006, vol. 20, no. 14, pp. 2512–2518. doi: 10.1096/fj.06-6616com*
83. Leavis H.L., Bonten M.J., Willems R.J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol., 2006, vol. 9, no. 5, pp. 454–460. doi: 10.1016/j.mib.2006.07.001*
84. Lee B.C., Kim M.S., Pae M., Yamamoto Y., Eberlé D., Shimada T., Kamei N., Park H.S., Sasorith S., Woo J.R., You J., Mosher W., Brady H.J., Shoelson S.E., Lee J. Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity. *Cell Metabolism, 2016, vol. 23, no. 4, pp. 685–698. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.002*
85. Lee V.T., Feehan D.D., Jamil K., Polyak M.J., Ogbomo H., Hasell M., Li S.S., Xiang R.F., Parkins M., Trapani J.A., Harrison J.J., Mody C.H. Natural killer cells kill extracellular Pseudomonas aeruginosa using contact-dependent release of granzymes B and H. *PLoS Pathog., 2022, vol. 18, no. 2: e1010325. doi: 10.1371/journal.ppat.1010325*

86. Li P., Sheng Q., Huang L.C., Turner J.H. Epithelial innate immune response to Pseudomonas aeruginosa-derived flagellin in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol., 2023. doi: 10.1002/alr.23164*
87. Librach C.L., Feigenbaum S.L., Bass K.E., Cui T.Y., Verastas N., Sadovsky Y., Quigley J.P., French D.L., Fisher S.J. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J. Biol. Chem., 1994, vol. 269, no. 25, pp. 17125–17131.*
88. Liesenborghs L., Meyers S., Lox M., Criel M., Claes J., Peetermans M., Trenson S., Vande Velde G., Vanden Berghe P., Baatsen P., Missiakas D., Schneewind O., Peetermans W.E., Hoylaerts M.F., Vanassche T., Verhamme P. Staphylococcus aureus endocarditis: distinct mechanisms of bacterial adhesion to damaged and inflamed heart valves. *Eur. Heart J., 2019, vol. 40, no. 39, pp. 3248–3259. doi: 10.1093/eurheartj/ehz175*
89. Liu F.-T., Yang S., Yang Z., Zhou P., Peng T., Yin J., Ye Z., Shan H., Yu Y., Li R., Auchtung J.M. An altered microbiota in the lower and upper female reproductive tract of women with recurrent spontaneous abortion. *Microbiol. Spectr., 2022, vol. 10, no. 3: e0046222 10.1128/spectrum.00462-22*
90. Liu Z.-Y., Yang H.-L., Wei C.-Y., Cai G.-H., Ye J.-D., Zhang C.-X., Sun Y.-Z. Commensal Bacillus siamensis LF4 induces antimicrobial peptides expression via TLRs and NLRs signaling pathways in intestinal epithelial cells of Lateolabrax maculatus. *Fish Shellfish Immunol., 2023, vol. 134: 108634. doi: 10.1016/j.fsi.2023.108634*
91. Lotzová E., Herberman R. Immunobiology of natural killer cells. *Boca Raton, 2019. doi: 10.1201/9780429288364*
92. Louis E., Galloway-Peña J., Roh J.H., Latorre M., Qin X., Murray B.E. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of Enterococcus faecium. *PLoS One, 2012, vol. 7, no. 1: e30187. doi: 10.1371/journal.pone.0030187*
93. Lowy F.D. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *J. Clin. Invest., 2003, vol. 111, no. 9, pp. 1265–1273. doi: 10.1172/JCI18535*
94. Luger T.A., Krutmann J., Kirnbauer R., Urbanski A., Schwarz T., Klappacher G., Kock A., Micksche M., Malejczyk J., Schauer E., et al. IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. *J. Immunol., 1989, vol. 143, no. 4, pp. 1206–1209.*
95. Mace E.M., Dongre P., Hsu H.T., Sinha P., James A.M., Mann S.S., Forbes L.R., Watkin L.B., Orange J.S. Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol. Cell. Biol., 2014, vol. 92, no. 3, pp. 245–255. doi: 10.1038/icb.2013.96*
96. Mammina C., Bonura C., di Carlo P., Calà C., Aleo A., Monastero R., Palma D.M. Daptomycin non-susceptible, vancomycin intermediate methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from a chronic leg ulcer, Italy. *Scand. J. Infect. Dis., 2010, vol. 42, no. 11–12, pp. 955–957. doi: 10.3109/00365548.2010.524662*
97. Manaster I., Mizrahi S., Goldman-Wohl D., Sela H.Y., Stern-Ginossar N., Lankry D., Gruda R., Hurwitz A., Bdolah Y., Haimov-Kochman R., Yagel S., Mandelboim O. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J. Immunol., 2008, vol. 181, no. 3, pp. 1869–1876. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1869*
98. Markovska R., Stoeva T., Dimitrova D., Boyanova L., Stankova P., Mihova K., Mitov I. Quinolone resistance mechanisms among third-generation cephalosporin resistant isolates of Enterobacter spp. in a Bulgarian university hospital. *Infect. Drug Resist., 2019, vol. 12, pp. 1445–1455. doi: 10.2147/idr.S204199*
99. Mateos M., Hernández-García M., del Campo R., Martínez-García L., Gijón D., Morosini M.I., Ruiz-Garbajosa P., Cantón R. Emergence and persistence over time of carbapenemase-producing Enterobacter isolates in a Spanish University Hospital in Madrid, Spain (2005–2018). *Microb. Drug Resist., 2021, vol. 27, no. 7, pp. 895–903. doi: 10.1089/mdr.2020.0265*
100. Matheeussen V., Xavier B.B., Mermans I., De Weerdt A., Lammens C., Goossens H., Jansens H., Malhotra-Kumar S. Emergence of colistin resistance during treatment of recurrent pneumonia caused by carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2019, vol. 94, no. 4, pp. 407–409. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.02.014*
101. McConnell M.J., Actis L., Pachon J. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev., 2013, vol. 37, no. 2, pp. 130–155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x*
102. Meunier E., Broz P. Evolutionary convergence and divergence in NLR function and structure. *Trends Immunol., 2017, vol. 38, no. 10, pp. 744–757. doi: 10.1016/j.it.2017.04.005*
103. Michałkiewicz J., Stachowski J., Barth C., Patzer J., Dzierżanowska D., Madaliński K. Effect of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A on IFN-γ synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. *Immunol. Lett., 1999, vol. 69, no. 3, pp. 359–366. doi: 10.1016/s0165-2478(99)00121-2*
104. Mikhailova V., Grebenkina P., Khokhlova E., Davydova A., Salloum Z., Tyshchuk E., Zagainova V., Markova K., Kogan I., Selkov S., Sokolov D. Pro- and anti-inflammatory cytokines in the context of NK cell-trophoblast interactions. *Int. J. Mol. Sci., 2022, vol. 23, no. 4: 2387. doi: 10.3390/ijms23042387*
105. Mikhailova V., Khokhlova E., Grebenkina P., Salloum Z., Nikolaenkov I., Markova K., Davidova A., Selkov S., Sokolov D. NK-92 cells change their phenotype and function when cocultured with IL-15, IL-18 and trophoblast cells. *Immunobiology, 2021, vol. 226, no. 5: 152125. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152125*
106. Mirandola P., Ponti C., Gobbi G., Sponzilli I., Vaccarezza M., Cocco L., Zauli G., Secchiero P., Manzoli F.A., Vitale M. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood, 2004, vol. 104, no. 8, pp. 2418–2424. doi: 10.1182/blood-2004-04-1294*
107. Mohd Sazlly Lim S., Zainal Abidin A., Liew S.M., Roberts J.A., Sime F.B. The global prevalence of multidrug-resistance among Acinetobacter baumannii causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect., 2019, vol. 79, no. 6, pp. 593–600. doi: 10.1016/j.jinf.2019.09.012*
108. Molgora M., Cortez V.S., Colonna M. Killing the invaders: NK cell impact in tumors and anti-tumor therapy. *Cancers (Basel), 2021, vol. 13, no. 4. doi: 10.3390/cancers13040595*
109. Montaldo E., Del Zotto G., Della Chiesa M., Mingari M.C., Moretta A., De Maria A., Moretta L. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A, 2013, vol. 83, no. 8, pp. 702–713. doi: 10.1002/cyto.a.22302*
110. Mourenza Á., Gil J.A., Mateos L.M., Letek M. Novel treatments and preventative strategies against food-poisoning caused by Staphylococcal species. *Pathogens, 2021, vol. 10, no. 2: 91. doi: 10.3390/pathogens10020091*

111. Mulani M.S., Kamble E.E., Kumkar S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front. Microbiol., 2019, vol. 10: 539. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539*
112. Naveed M., Jabeen K., Naz R., Mughal M.S., Rabaan A.A., Bakhrebah M.A., Alhoshani F.M., Aljeldah M., Shammari B.R.A., Alissa M., Sabour A.A., Alaeq R.A., Alshiekheid M.A., Garout M., Almogbel M.S., Halwani M.A., Turkistani S.A., Ahmed N. Regulation of host immune response against Enterobacter cloacae proteins via computational mRNA vaccine design through transcriptional modification. *Microorganisms, 2022, vol. 10, no. 8: 1621. doi: 10.3390/microorganisms10081621*
113. Nelson D.B., Hanlon A.L., Wu G., Liu C., Fredricks D.N. First trimester levels of BV-associated bacteria and risk of miscarriage among women early in pregnancy. *Matern. Child Health J., 2015, vol. 19, no. 12, pp. 2682–2687. doi: 10.1007/s10995-015-1790-2*
114. Opoku-Temeng C., Kobayashi S.D., DeLeo F.R. Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput. Struct. Biotechnol. J., 2019, vol. 17, pp. 1360–1366. doi: 10.1016/j.csbj.2019.09.011*
115. Orfali R.L., Yoshikawa F.S.Y., Oliveira L.M.D.S., Pereira N.Z., de Lima J.F., Ramos Y.Á.L., Duarte A.J.D.S., Sato M.N., Aoki V. Staphylococcal enterotoxins modulate the effector CD4+ T cell response by reshaping the gene expression profile in adults with atopic dermatitis. *Sci. Rep., 2019, vol. 9, no. 1: 13082. doi: 10.1038/s41598-019-49421-5*
116. Otun H.A., Lash G.E., Innes B.A., Bulmer J.N., Naruse K., Hannon T., Searle R.F., Robson S.C. Effect of tumour necrosis factor-α in combination with interferon-γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. *J. Reproduct. Immunol., 2011, vol. 88, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.jri.2010.10.003*
117. Parodi M., Favoreel H., Candiano G., Gaggero S., Sivori S., Mingari M.C., Moretta L., Vitale M., Cantoni C. NKp44-NKp44 ligand interactions in the regulation of natural killer cells and other innate lymphoid cells in humans. *Front. Immunol., 2019, vol. 10: 719. doi: 10.3389/fimmu.2019.00719*
118. Paul S., Lal G. the molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front. Immunol., 2017, vol. 8: 1124. doi: 10.3389/fimmu.2017.01124*
119. Pechere J.C., Kohler T. Patterns and modes of beta-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Clin. Microbiol. Infect., 1999, vol. 5, suppl. 1, pp. S15–S18. doi: 10.1111/j.1469-0691.1999.tb00719.x*
120. Pedersen B.K., Kharazmi A. Inhibition of human natural killer cell activity by Pseudomonas aeruginosa alkaline protease and elastase. *Infect. Immun., 1987, vol. 55, no. 4, pp. 986–989. doi: 10.1128/iai.55.4.986-989.1987*
121. Peng H., Wisse E., Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell. Mol. Immunol., 2015, vol. 13, no. 3, pp. 328–336. doi: 10.1038/cmi.2015.96*
122. Peri F., Piazza M., Calabrese V., Damore G., Cighetti R. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochem. Soc. Trans., 2010, vol. 38, no. 5, pp. 1390–1395. doi: 10.1042/bst0381390*
123. Pfaller M.A., Cormican M., Flamm R.K., Mendes R.E., Jones R.N. Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of Enterococci: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–2016. *Open Forum Infect. Dis., 2019, vol. 6, suppl. 1, pp. S54–S62. doi: 10.1093/ofid/ofy344*
124. Prince A., Lacey K.A., Mulcahy M.E., Towell A.M., Geoghegan J.A., McLoughlin R.M. Clumping factor B is an important virulence factor during Staphylococcus aureus skin infection and a promising vaccine target. *PLoS Pathog., 2019, vol. 15, no. 4: e1007713. doi: 10.1371/journal.ppat.1007713*
125. Prutsch N., Fock V., Haslinger P., Haider S., Fiala C., Pollheimer J., Knofler M. The role of interleukin-1beta in human trophoblast motility. *Placenta, 2012, vol. 33, no. 9, pp. 696–703. doi: 10.1016/j.placenta.2012.05.008*
126. Quatrini L., Della Chiesa M., Sivori S., Mingari M.C., Pende D., Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol., 2021, vol. 51, no. 7, pp. 1566–1579. doi: 10.1002/eji.202049028*
127. Rice L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J. Infect. Dis., 2008, vol. 197, no. 8, pp. 1079–1081. doi: 10.1086/533452*
128. Roussev R.G., Dons'koi B.V., Stamatkin C., Ramu S., Chernyshov V.P., Coulam C.B., Barnea E.R. Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: implications for recurrent pregnancy loss therapy. *Reprod. Biomed. Online, 2013, vol. 26, no. 1, pp. 79–87. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.09.017*
129. Salim F., Gunawan H., Suwarsa O., Sutedja E. Increased expression of Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR6 on peripheral blood monocytes by induction of Staphylococcal enterotoxin B during exacerbation of atopic dermatitis patients. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol., 2023, vol. 16, pp. 301–307. doi: 10.2147/ccid.S401815*
130. Salmanov A.G., Ishchak O.M., Shostak Y.M., Kozachenko V.V., Rud V.O., Golyanovskiy O.V., Shkorbotun V.O. Bacterial infection causes of pregnancy loss and premature birth in the women in Ukraine. *Wiadomo ci Lekarskie, 2021, vol. 74, no. 6, pp. 1355–1359. doi: 10.36740/WLek202106113*
131. Schlievert P.M., Davis C.C. Device-associated menstrual toxic shock syndrome. *Clin. Microbiol. Rev., 2020, vol. 33, no. 3: e00032-19. doi: 10.1128/cmr.00032-19*
132. Schönian G., Fernández-Figueroa E.A., Imaz-Rosshandler I., Castillo-Fernández J.E., Miranda-Ortiz H., Fernández-López J.C., Becker I., Rangel-Escareño C. Down-regulation of TLR and JAK/STAT pathway genes is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis: a gene expression analysis in NK cells from patients infected with Leishmania mexicana. *PLoS Negl. Trop. Dis., 2016, vol. 10, no. 3: e0004570. doi: 10.1371/journal.pntd.0004570*
133. Screpanti V., Wallin R.P.A., Grandien A., Ljunggren H.-G. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol. Immunol., 2005, vol. 42, no. 4, pp. 495–499. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.033*
134. Shekhar S., Peng Y., Gao X., Joyee A.G., Wang S., Bai H., Zhao L., Yang J., Yang X. NK cells modulate the lung dendritic cell-mediated Th1/Th17 immunity during intracellular bacterial infection. *Eur. J. Immunol., 2015, vol. 45, no. 10, pp. 2810–2820. doi: 10.1002/eji.201445390*
135. Singh S., Almuhanna Y., Alshahrani M.Y., Lowman D.W., Rice P.J., Gell C., Ma Z., Graves B., Jackson D., Lee K., Juarez R., Koranteng J., Muntaka S., Daniel A.M., da Silva A.C., Hussain F., Yilmaz G., Mastrotto F., Irie Y., Williams P., Williams D.L., Cámara M., Martinez-Pomares L. Carbohydrates from Pseudomonas aeruginosa biofilms interact with immune C-type lectins and interfere with their receptor function. *NPJ Biofilms Microbiomes, 2021, vol. 7, no. 1: 87. doi: 10.1038/s41522-021-00257-w*

136. Sivori S., Vacca P., Del Zotto G., Munari E., Mingari M.C., Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol., 2019, vol. 16, no. 5, pp. 430–441. doi: 10.1038/s41423-019-0206-4*
137. Slater C.L., Winogrodzki J., Fraile-Ribot P.A., Oliver A., Khajehpour M., Mark B.L. Adding insult to injury: mechanistic basis for how AmpC mutations allow Pseudomonas aeruginosa to accelerate cephalosporin hydrolysis and evade avibactam. *Antimicrob. Agents. Chemother., 2020, vol. 64, no. 9: e00894-20. doi: 10.1128/aac.00894-20*
138. Small C.L., McCormick S., Gill N., Kugathasan K., Santosuosso M., Donaldson N., Heinrichs D.E., Ashkar A., Xing Z. NK cells play a critical protective role in host defense against acute extracellular Staphylococcus aureus bacterial infection in the lung. *J. Immunol., 2008, vol. 180, no. 8, pp. 5558–5568. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5558*
139. Smoke S.M., Brophy A., Reveron S., Iovleva A., Kline E.G., Marano M., Miller L.P., Shields R.K. Evolution and transmission of Cefiderocol-resistant Acinetobacter baumannii during an outbreak in the burn intensive care unit. *Clin. Infect. Dis., 2023, vol. 76, no. 3, pp. e1261–e1265. doi: 10.1093/cid/ciac647*
140. Sparo M., Delpech G., Batisttelli S., Basualdo J.Á. Immunomodulatory properties of cell wall extract from Enterococcus faecalis CECT7121. *Braz. J. Infect. Dis., 2014, vol. 18, no. 5, pp. 551–555. doi: 10.1016/j.bjid.2014.05.005*
141. Stewart A.G., Paterson D.L., Young B., Lye D.C., Davis J.S., Schneider K., Yilmaz M., Dinleyici R., Runnegar N., Henderson A., Archuleta S., Kalimuddin S., Forde B.M., Chatfield M.D., Bauer M.J., Lipman J., Harris-Brown T., Harris P.N.A., Chia P.Y., Cross G., Somani J., Yan G. Meropenem versus piperacillin-tazobactam for definitive treatment of bloodstream infections caused by AmpC β-lactamase-producing Enterobacter spp., Citrobacter freundii, Morganella morganii, Providencia spp., or Serratia marcescens: a pilot multicenter randomized controlled trial (MERINO-2). *Open Forum Infect. Dis., 2021, vol. 8, no. 8: ofab387. doi: 10.1093/ofid/ofab387*
142. Strateva T., Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa — a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol., 2009, vol. 58, pt 9, pp. 1133–1148. doi: 10.1099/jmm.0.009142-0*
143. Sun J., Yang M., Ban Y., Gao W., Song B., Wang Y., Zhang Y., Shao Q., Kong B., Qu X. Tim-3 Is Upregulated in NK cells during early pregnancy and Inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway. *PLoS One, 2016, vol. 11, no. 1: e0147186. doi: 10.1371/journal.pone.0147186*
144. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outterson K., Patel J., Cavaleri M., Cox E.M., Houchens C.R., Grayson M.L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N., WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet. Infect. Dis., 2018, vol. 18, no. 3, pp. 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3*
145. Tallant T., Deb A., Kar N., Lupica J., de Veer M.J., DiDonato J.A. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol., 2004, vol. 4: 33. doi: 10.1186/1471-2180-4-33*
146. Tamma P.D., Aitken S.L., Bonomo R.A., Mathers A.J., van Duin D., Clancy C.J. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of AmpC β-lactamase-producing enterobacterales, carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii, and Stenotrophomonas maltophilia infections. *Clin. Infect. Dis., 2022, vol. 74, no. 12, pp. 2089–2114. doi: 10.1093/cid/ciab1013*
147. Tan H.X., Yang S.L., Li M.Q., Wang H.Y. Autophagy suppression of trophoblast cells induces pregnancy loss by activating decidual NK cytotoxicity and inhibiting trophoblast invasion. *Cell. Commun. Signal., 2020, vol. 18, no. 1: 73. doi: 10.1186/s12964-020-00579-w*
148. Tarazona R., Lopez-Sejas N., Guerrero B., Hassouneh F., Valhondo I., Pera A., Sanchez-Correa B., Pastor N., Duran E., Alonso C., Solana R. Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer. Immunol. Immunother., 2020, vol. 69, no. 5, pp. 879–899. doi: 10.1007/s00262-020-02532-9*
149. Tsuchiya T., Nakao N., Yamamoto S., Hirai Y., Miyamoto K., Tsujibo H. NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with Acinetobacter baumannii pneumonia. *Microbiol. Immunol., 2012, vol. 56, no. 2, pp. 107–116. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00402.x*
150. Valore E.V., Park C.H., Quayle A.J., Wiles K.R., McCray P.B. Jr., Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest., 1998, vol. 101, no. 8, pp. 1633–1642. doi: 10.1172/JCI1861*
151. Van Elssen C.H., Vanderlocht J., Frings P.W., Senden-Gijsbers B.L., Schnijderberg M.C., van Gelder M., Meek B., Libon C., Ferlazzo G., Germeraad W.T., Bos G.M. Klebsiella pneumoniae-triggered DC recruit human NK cells in a CCR5-dependent manner leading to increased CCL19-responsiveness and activation of NK cells. *Eur. J. Immunol., 2010, vol. 40, no. 11, pp. 3138–3149. doi: 10.1002/eji.201040496*
152. Vankayalapati R., Garg A., Porgador A., Griffith D.E., Klucar P., Safi H., Girard W.M., Cosman D., Spies T., Barnes P.F. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol., 2005, vol. 175, no. 7, pp. 4611–4617. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4611*
153. Vankayalapati R., Wizel B., Weis S.E., Safi H., Lakey D.L., Mandelboim O., Samten B., Porgador A., Barnes P.F. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol., 2002, vol. 168, no. 7, pp. 3451–3457. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3451*
154. Veneziani I., Alicata C., Pelosi A., Landolina N., Ricci B., D'Oria V., Fagotti A., Scambia G., Moretta L., Maggi E. Toll-like receptor 8 agonists improve NK-cell function primarily targeting CD56(bright)CD16(–) subset. *J. Immunother. Cancer, 2022, vol. 10, no. 1: e003385. doi: 10.1136/jitc-2021-003385*
155. Victor A.R., Weigel C., Scoville S.D., Chan W.K., Chatman K., Nemer M.M., Mao C., Young K.A., Zhang J., Yu J., Freud A.G., Oakes C.C., Caligiuri M.A. Epigenetic and Posttranscriptional Regulation of CD16 Expression during Human NK Cell Development. *J. Immunol., 2018, vol. 200, no. 2, pp. 565–572. doi: 10.4049/jimmunol.1701128*
156. Viel S., Marcais A., Guimaraes F.S., Loftus R., Rabilloud J., Grau M., Degouve S., Djebali S., Sanlaville A., Charrier E., Bienvenu J., Marie J.C., Caux C., Marvel J., Town L., Huntington N.D., Bartholin L., Finlay D., Smyth M.J., Walzer T. TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal., 2016, vol. 9, no. 415: 19. doi: 10.1126/scisignal.aad1884*

157. Wang R., Jaw J.J., Stutzman N.C., Zou Z., Sun P.D. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J. Leukoc. Biol., 2012, vol. 91, no. 2, pp. 299–309. doi: 10.1189/jlb.0611308*
158. Wesselkamper S.C., Eppert B.L., Motz G.T., Lau G.W., Hassett D.J., Borchers M.T. NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against Pseudomonas aeruginosa respiratory infection. *J. Immunol., 2008, vol. 181, no. 8, pp. 5481–5489. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5481*
159. Wolf N.K., Kissiov D.U., Raulet D.H. Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol., 2022, vol. 23, no. 2, pp. 90–105. doi: 10.1038/s41577-022-00732-1*
160. Wu G., Zhu Q., Zeng J., Gu X., Miao Y., Xu W., Lv T., Song Y. Extracellular mitochondrial DNA promote NLRP3 inflammasome activation and induce acute lung injury through TLR9 and NF-κB. *J. Thorac. Dis., 2019, vol. 11, no. 11, pp. 4816–4828. doi: 10.21037/jtd.2019.10.26*
161. Wu W., Wei L., Feng Y., Xie Y., Zong Z. Precise Species Identification by Whole-Genome Sequencing of Enterobacter Bloodstream Infection, China. *Emerg. Infect. Dis., 2021, vol. 27, no. 1, pp. 161–169. doi: 10.3201/eid2701.190154*
162. Wu X., Jin L.P., Yuan M.M., Zhu Y., Wang M.Y., Li D.J. Human first-trimester trophoblast cells recruit $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. *J. Immunol., 2005, vol. 175, no. 1, pp. 61–68. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.61*
163. Xie X., Ma L., Zhou Y., Shen W., Xu D., Dou J., Shen B., Zhou C. Polysaccharide enhanced NK cell cytotoxicity against pancreatic cancer via TLR4/MAPKs/NF-κB pathway in vitro/vivo. *Carbohydr. Polym., 2019, vol. 225: 115223. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115223*
164. Xu X., Weiss I.D., Zhang H.H., Singh S.P., Wynn T.A., Wilson M.S., Farber J.M. Conventional NK cells can produce IL-22 and promote host defense in Klebsiella pneumoniae pneumonia. *J. Immunol., 2014, vol. 192, no. 4, pp. 1778–1786.*
165. Yang X., Yang Y., Yuan Y., Liu L., Meng T. The roles of uterine natural killer (NK) cells and KIR/HLA-C combination in the development of preeclampsia: a systematic review. *Biomed. Res. Int., 2020, vol. 2020: 4808072. doi: 10.1155/2020/4808072*
166. Yang Y., Yin C., Pandey A., Abbott D., Sassetti C., Kelliher M.A. NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J. Biol. Chem., 2007, vol. 282, no. 50, pp. 36223–36229. doi: 10.1074/jbc.M703079200*
167. Yu J., Caligiuri M.A. Viral- and tumor-reactive natural killer cells. *Semin. Immunol., 2023, vol. 67: 101749. doi: 10.1016/j.smim.2023.101749*
168. Yu J., Wei M., Becknell B., Trotta R., Liu S., Boyd Z., Jaung M.S., Blaser B.W., Sun J., Benson D.M., Mao H., Yokohama A., Bhatt D., Shen L., Davuluri R., Weinstein M., Marcucci G., Caligiuri M.A. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity, 2006, vol. 24, no. 5, pp. 575–590. doi: 10.1016/j.immuni.2006.03.016*
169. Zaghi E., Calvi M., Marcenaro E., Mavilio D., Di Vito C. Targeting NKG2A to elucidate natural killer cell ontogenesis and to develop novel immune-therapeutic strategies in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol., 2019, vol. 105, no. 6, pp. 1243–1251. doi: 10.1002/jlb.Mr0718-300r*
170. Zhang Y., Huang C., Lian R., Xu J., Fu Y., Zeng Y., Tu W. The low cytotoxic activity of peripheral blood NK cells may relate to unexplained recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol., 2021, vol. 85, no. 6: e13388. doi: 10.1111/aji.13388*
171. Zheng Y., Valdez P.A., Danilenko D.M., Hu Y., Sa S.M., Gong Q., Abbas A.R., Modrusan Z., Ghilardi N., de Sauvage F.J., Ouyang W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med., 2008, vol. 14, no. 3, pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720*
172. Zou M.Z., Liu W.L., Gao F., Bai X.F., Chen H.S., Zeng X., Zhang X.Z. Artificial natural killer cells for specific tumor inhibition and renegade macrophage re-education. *Adv. Mater., 2019, vol. 31, no. 43: e1904495. doi: 10.1002/adma.201904495*

**Авторы:**
**Гребенкина П.В.**, младший научный сотрудник ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия; аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Сельков С.А.**, д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, 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;
**Соколов Д.И.**, д.б.н., доцент, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**
**Grebenkina P.V.**, Junior Researcher, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation; PhD Student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Selkov S.A.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology and Intercellular Interactions, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation;
**Kraeva L.A.**, DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;
**Sokolov D.I.**, DSc (Biology), Associate Professor, Head of Laboratory of Intercellular Interactions, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.07.2023
Принята к печати 28.08.2023

Received 19.07.2023
Accepted 28.08.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 627–641

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 627–641

# ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬФАВИРУСОВ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

**А.С. Назаренко[1], Ю.К. Бирюкова[1], Н.М. Колясникова[1], М.Ф. Ворович[1,2], Н.Б. Пестов[1], А.А. Ишмухаметов[1,2]**

*[1] ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия*
*[2] ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия*

**Резюме.** Онколитическая вирусная терапия признана многообещающим терапевтическим подходом к лечению опухолей. Онколитические вирусы способны оказывать как прямое лизирующее действие на опухолевые клетки, так и опосредованное — через активацию противоопухолевого иммунитета. Альфавирусы в качестве онколитических вирусов могут быть весьма перспективными из-за низкой патогенности некоторых из них, способности селективно заражать и лизировать опухолевые клетки, ремодулировать микроопухолевое окружение, вызывать иммуноопосредованный лизис опухолевых клеток. Кроме того, альфавирусы могут выступать удобной платформой для доставки трансгенов. С целью повышения безопасности при использовании методов генной инженерии в качестве основы, как правило, выбираются аттенуированные штаммы альфавирусов, которые не являются патогенными, а в качестве трансгенов чаще всего применяются опухоль-ассоциированные антигены или антигены, которые сами по себе являются иммуногенными, такие как цитокины и другие иммуностимулирующие молекулы. На сегодняшний день количество исследований по оценке онколитических и иммуномодулирующих эффектов альфавирусов и векторов на их основе как *in vitro*, так и *in vivo* растет в геометрической прогрессии. На данный момент онколитическую и иммуномодулирующую активность альфавирусов Синдбис, леса Семлики, Гета (штамм M1), венесуэльского энцефаломиелита лошадей и векторов на их основе изучали на животных моделях меланомы, глиомы, остеосаркомы, рака молочной железы, аденокарциномы легких, карциномы предстательной железы и других типах опухолей. Усиленную противоопухолевую активность альфавирусы демонстрируют в комбинированной терапии с другими онколитическими вирусами, цитостатиками, а также блокаторами иммунных контрольных точек. Среди вирусных векторов альфавирусоподобные репликоновые частицы, основанные на аттенуированном вирусе венесуэльского энцефаломиелита лошадей, особенно привлекательны благодаря высокой экспрессии гетерологичных белков, а также индукции гуморального и клеточного иммунного ответа. Вакцина на основе такого альфавирусного вектора, кодирующего внеклеточный и трансмембранный домены HER2, уже показала безопасность и противоопухолевую эффективность на доклинических мышиных моделях и в первой фазе клинических исследований у пациентов с прогрессирующим раком молочной железы со сверхэкспрессией

**Адрес для переписки:**
Назаренко Алина Сергеевна
108819, Россия, Москва, пос. Московский, п. Института полиомиелита, двлд. 8, корп. 1, ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).
Тел.: 8 (495) 531-01-70 (внутр. 32-36).
E-mail: nazarenko_as@chumakovs.su

**Contacts:**
Alina S. Nazarenko
108819, Russian Federation, Moscow, Settlement "Moskovskiy", Village of Institute of Poliomyelitis, Premises 8, build. 1, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis).
Phone: +7 (495) 531-01-70 (internal 32-36).
E-mail: nazarenko_as@chumakovs.su

**Для цитирования:**
Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К., Колясникова Н.М., Ворович М.Ф., Пестов Н.Б., Ишмухаметов А.А. Перспективы использования альфавирусов в противоопухолевой терапии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 627–641. doi: 10.15789/2220-7619-PFA-12111

**Citation:**
Nazarenko A.S., Biryukova Yu.K., Kolyasnikova N.M., Vorovitch M.F., Pestov N.B., Ishmukhametov A.A. Perspectives for applying Alphaviruses in antitumor therapy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 627–641. doi: 10.15789/2220-7619-PFA-12111



**DOI:** http://dx.doi.org/ 10.15789/2220-7619-PFA-12111

HER2. Было продемонстрировано, что вакцина безопасна, эффективна и успешно индуцирует Т-клеточный иммунитет. В данном обзоре мы обсуждаем результаты доклинических и клинических исследований, а также перспективы использования альфавирусов в онколитической виротерапии.

***Ключевые слова:*** *онколитические вирусы, альфавирусы, виротерапия, иммунотерапия, вирусный вектор, рекомбинантный вирус, иммунотерапия рака.*

## PERSPECTIVES FOR APPLYING ALPHAVIRUSES IN ANTITUMOR THERAPY

**Nazarenko A.S.[a], Biryukova Yu.K.[a], Kolyasnikova N.M.[a], Vorovitch M.F.[a,b], Pestov N.B.[a], Ishmukhametov A.A.[a,b]**

[a] *M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute), Moscow, Russian Federation*

[b] *Institute of Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Oncolytic viral therapy is a promising approach for treating tumors. Oncolytic viruses can directly lyse tumor cells and indirectly activate antitumor immunity. Alphaviruses, as oncolytic viruses, are particularly promising agents because they can selectively infect and lyse tumor cells, modulate microtumor environment, elicit immune-mediated lysis of tumor cells, and serve as a platform for transgene delivery. To ensure safety, attenuated strains of Alphaviruses are typically used for genetic engineering, and immunogenic tumor-associated antigens or cytokines are commonly chosen as transgenes. Studies evaluating both *in vitro* and *in vivo* oncolytic and immunomodulatory effects of Alphaviruses and vectors based on them have been growing exponentially. Animal models of various tumor types were used to examine the effectiveness of Alphaviruses, including Sindbis, Semliki Forest virus, Geta (strain M1), Venezuelan equine encephalitis virus, and vectors based on them. Additionally, Alphaviruses revealed enhanced antitumor activity while used in combination therapies with other oncolytic viruses. Alphavirus-like replicon particles based on attenuated Venezuelan equine encephalitis virus may serve for transgene delivery to express heterologous proteins at high levels, and induce both humoral and cellular immune responses. An alphaviral vector-based vaccine, encoding the HER2 extracellular and transmembrane domains, has demonstrated safety and efficacy in preclinical mouse models, as well as in phase I clinical trials for advanced breast cancer patients with HER2 overexpression. This vaccine is known to be safe, effective, and capable of inducing T-cell immunity. In this review, we discuss the current progress in preclinical and clinical investigations, as well as the future potential of Alphaviruses for oncolytic virotherapy.

***Key words:*** *oncolytic viruses, Alphaviruses, virotherapy, immunotherapy, viral vector, recombinant virus, cancer immunotherapy.*

## Введение

Онколитическая вирусная терапия (ОВТ) — это иммунотерапия, в которой используются природные или генетически модифицированные вирусы для специфического заражения и лизиса раковых клеток, но без вреда для нормальных клеток [15]. Уже больше века различные вирусы исследуются в качестве возможных агентов для лечения опухолей различной этиологии [17]. С развитием технологии клонирования с помощью генной инженерии стало возможным создавать множество вирусных векторов как для селективного заражения и лизиса опухолевых клеток, так и в качестве трансгенных носителей [47]. Более глубокое понимание механизмов действия вирусов, включая активацию врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета, и их способности модулирования опухолевого микроокружения, дало импульс активному развитию виротерапии в последнее десятилетие [26]. На данный момент для лечения различных видов рака одобрено четыре препарата на основе онколитических вирусов: Talimogene laherparepvec (США) [16], Delytact (Япония) [6], Oncorine (Китай) [22], Rigvir (Латвия) [1]. При этом еще более широкий спектр онколитических вирусов и векторов, таких как ДНК вирусы семейств *Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Parvoviridae* и РНК вирусы семейств *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Alphaviruses*, находится на стадии клинических испытаний для терапии различных типов рака [61]. Многие вирусы обладают онколитическим потенциалом, что подтверждается рядом весьма успешных доклинических исследований. В этом обзоре мы ставим перед собой задачу описать потенциал применения вирусов рода *Alphavirus* в качестве онколитических препаратов и их использования в комбинации с другими иммунотерапевтическими средствами в недавних доклинических и клинических исследованиях.

## Альфавирусы. Жизненный цикл альфавирусов

Вирионы альфавирусов состоят из икосаэдрического нуклеокапсида, окруженного липидной оболочкой — суперкапсидом. Геном альфавирусов размером 11–12 тыс. н.о. представлен кэпированной позитивной РНК с полиА на 3'-конце. Основными структурными белками вириона являются С, Е1, Е2 (Е3), где гликопроте-

ины E1 и E2 встроены в суперкапсид вириона и образуют около 80 шипов, которые отвечают за взаимодействие с клеточным рецептором и проникновение вируса в клетки-мишени [43]. Также в суперкапсиде присутствуют два виропорина — белки TF и 6K, которые участвуют в почковании альфавирусов [34]. Альфавирусы проникают в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с последующим раздеванием нуклеокапсида и высвобождением вирусной РНК в цитоплазму [21]. Вирусная РНК является матричной для синтеза белков и содержит две открытые рамки считывания: первая открытая рамка считывания занимает $^2/_3$ всего генома и кодирует полипептид P1234, в то время как вторая рамка считывания кодирует структурные белки (рис.). Как только вирусная РНК проникает в цитоплазму начинается трансляция полипротеина P1234 с последующим расщеплением на полипротеин P123 и неструктурный белок nsp4. Затем белок P123 расщепляется с образованием трех неструктурных белков: nsp1, nsp2, nsp3. Продукты частичного расщепления неструктурного полипротеина — белки P123 и nsp4 инициируют синтез отрицательной цепи РНК, а белки nsp1, P123 и nsp4 образуют репликативный комплекс, который активен как для синтеза отрицательной цепи РНК, так и для синтеза геномной РНК. Полное расщепление P123 приводит к окончательному переключению с синтеза отрицательной цепи РНК на синтез геномной РНК [21]. Со второй открытой рамки считывания с отрицательной цепи РНК синтезируется субгеномная РНК (sgRNA) с CAP на 5'-конце и полиА на 3'-конце. С sgRNA транслируется полипептид p130, который потом расщепляется на полипептиды E2, слитый с E3, E1, C и гидрофобные мембранные белки TF и 6K [42]. E2 с E3 и E1 транспортируются к плазматической мембране через аппарат Гольджи, где подвергаются гликозилированию и пальмитоилированию, E3 отщепляется от E2, однако они остаются в тесной связи. Затем E1 и E2 образуют гетеротримеры, формируя вирус-

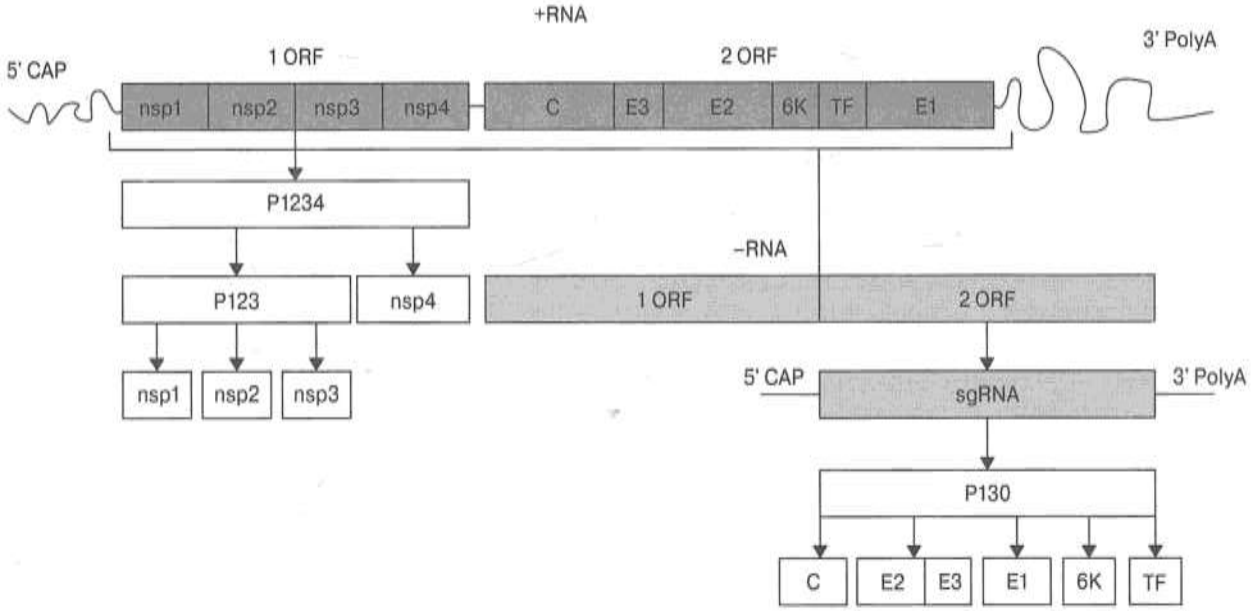


**Рисунок. Схема генома альфавирусов**

Figure. Alphavirus genome structure

**Примечание**. РНК альфавирусов — одноцепочечная положительная (+RNA) и содержит две открытые рамки считывания: 1 ORF — кодирует полипептид P1234; 2 ORF — кодирует структурные белки. Трансляция начинается с полипротеина P1234 с последующим его расщеплением на полипротеин P123 и неструктурный белок nsp4. Белок P123 расщепляется с образованием трех неструктурных белков: nsp1, nsp2, nsp3. Продукты частичного расщепления неструктурного полипротеина — белки P123 и nsp4 инициируют синтез отрицательной цепи РНК (–RNA). Со второй открытой рамки считывания с отрицательной цепи РНК синтезируется субгеномная РНК (sgRNA) с CAP на 5'-конце и полиА на 3'-конце. С sgRNA транслируется полипептид p130, который потом расщепляется на полипептиды E2, слитый с E3, E1, C и гидрофобные мембранные белки TF и 6K.

Note. Alphavirus bears positive RNA (+RNA) that contains two open reading frames: 1 ORF encodes polypeptide P1234; 2 ORF encodes structural proteins. Translation starts from polyprotein P1234 to be then cleaved into polyprotein P123 and non-structural protein nsp4. Protein P123 is cleaved to form three non-structural proteins: nsp1, nsp2, nsp3. The products of partial cleavage of non-structural polyprotein, P123 and nsp4, initiate the synthesis of negative chain RNA (–RNA). From the second open reading frame, subgenomic RNA (sgRNA) with 5'-end CAP and 3'-end polyA is synthesized from the negative RNA chain. From the sgRNA, polypeptide p130 is translated followed by its cleavage into polypeptides E2 fused with E3, E1, C and the hydrophobic membrane proteins TF and 6K

ные шипы [40]. Процесс почкования управляется специфическими взаимодействиями между предварительно сформированным нуклеокапсидом и шипами, что приводит к выходу вирионов во внеклеточную среду [45, 63].

Вирусы рода *Alphavirus* принадлежат к семейству *Togaviridae*. В природе основными переносчиками являются комары, которые передают альфавирусы позвоночным хозяевам трансмиссивным путем по классическому циклу передачи арбовирусов. Некоторые альфавирусы, такие как вирусы Чикунгунья, О'Ньонг-Ньонг, Росс-Ривер, Синдбис, леса Семлики, а также вирусы энцефаломиелитов (Восточный, Западный, Венесуэльский), являются патогенными для человека, и, в основном, вызывают острое (от 3 до 7 дней) лихорадочное заболевание с недомоганием, сыпью, артралгиями и иногда артритом, в тяжелых случаях болезнь может приводить к энцефалитам и параличам [27].

Альфавирусы могут использовать несколько клеточных рецепторов для прикрепления и проникновения в клетку-мишень, а именно MHC 1, высокоаффинный рецептор ламинина, NRAMP2, гепарансульфат, лектины С-типа клеточной поверхности, фосфатидилсериновые рецепторы и др. [19, 41, 55, 64]. Следует отметить, что высокоаффинный рецептор ламинина в большом количестве экспрессируется при различных видах злокачественных клеток по сравнению с нетрансформированными клетками [2, 54]. Однако в основном способность альфавирусов к репродукции в опухолевых клетках определяется внутриклеточными факторами, влияющими на вирусную репликацию и трансляцию, такими как двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа (PKR), РНКаза L, белки класса Mx и др. [37].

## Онколитический потенциал альфавирусов

За счет способности проникать в клетки различного типа, низкой патогенности, способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, размножаться в опухолевых клетках, вызывать противоопухолевые эффекты, а также в связи с наличием разработанных генетических модификаций генома альфавирусы могут быть использованы для онковиротерапии. На данный момент онколитическая и иммуномодулирующая активность альфавирусов Синдбис (Sindbis, SIN, SV), вируса леса Семлики (Semliki Forest virus, SFV), альфавируса M1, вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (Venezuelan equine encephalitis virus, VEE) изучена на животных моделях и в первой фазе клинических испытаний у людей (табл. 1).

### Вирус леса Семлики

Штамм SFV A7(74) дикого типа является авирулентным и у взрослых грызунов не вызывает патологий, приводящих к летальному исходу [3], поэтому его производное — репликативно-компетентный вектор SFV VA7-EGFP, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок в качестве флуоресцентной метки, в последние годы активно изучается как онколитический агент. В исследовании [52] авторы показали, что SFV VA7-EGFP проявляет активность в отношении клеточных линий меланомы человека A2058 и SK-MEL-5, аденокарциномы толстой кишки человека LS174T и SW620, в то время как на карциноме легкого человека A549 эффект был ограничен, а нейробластома мыши C-1300 оказалась устойчивой к действию вируса. Авторы также проверили эффективность вируса SFV VA7-EGFP *in vivo* на клеточной линии человеческой меланомы A2058, которая была подкожно введена иммунодефицитным мышам SCID. В результате действия SFV VA7-EGFP наблюдались как регресс опухоли, так и неврологические симптомы, появление которых, вероятно, было связано с отсутствием адаптивного иммунитета у данной группы мышей. Также авторы обнаружили, что клеточная смерть происходит, в основном, по механизму некроза, а не апоптоза. В других исследованиях [25] были использованы мыши Nude с подкожной моделью опухоли — карциномы легких человека A549. При введении SFV VA7-EGFP неврологических симптомов у животных не наблюдалось, хотя вирус обнаруживался в мозге. Противоопухолевый эффект при внутриопухолевом введении был весьма слабым, а при внутривенном введении эффект практически отсутствовал; такой же ответ на лечение наблюдался и на модели глиомы крысы BT4C [24]. Вероятно, слабая онколитическая активность данного вектора связана с его чувствительностью к интерферону 1 типа, сигнальные пути активации которого хоть и часто нарушены при злокачественных опухолях, но все же не всегда. Тем не менее в опухолях с нарушенными механизмами внутриклеточной защиты SFV VA7-EGFP весьма эффективен. Это было показано на подкожной модели остеосаркомы человека Saos2LM7 [18], в ортотопических и подкожных опухолях рака предстательной железы LNCaP и в ортотопической опухоли остеосаркомы мыши K7M3, где на фоне виротерапии терапии наблюдался регресс опухоли, а также увеличение продолжительности жизни мышей [30]. Поскольку штамм SFV A7(74) является нейротропным, он может представлять большой интерес в качестве онколитического вируса для лечения глиом. Для проверки данной гипотезы вирус внутривенно вводили мышам Nude с под-

**Таблица 1. Противоопухолевая эффективность альфавирусов**

Table 1. Antitumour efficiency of Alphaviruses

| Вирус Virus | Штамм Strain | Тип опухоли (модель) Tumour type (model) | Животная модель Animal model | Противоопухолевые эффекты Antitumour effects | Ссылка на исследование References |
|---|---|---|---|---|---|
| SFV | VA7-EGFP | **Меланома человека A2058 (подкожная)** Human melanoma A2058 (subcutaneous) | **SCID мыши** SCID mice | **Регресс опухоли, неврологические симптомы** Tumour regression, neurological symptoms | [52] |
| | | **Аденокарцинома легких человека A549 (ортотопическая)** Human lung adenocarcinoma A549 (orthotopic) | **Nude мыши** Nude mice | **Увеличение времени жизни без регресса опухоли** Increased survival without tumour regression | [25] |
| | | **Остеосаркома человека Saos2LM7 (подкожная)** Human osteosarcoma Saos2LM7 (subcutaneous) | **Nude мыши** Nude mice | **Регресс опухоли** Tumour regression | [18] |
| | | **Остеосаркома мыши K7M3 (ортотопическая)** Mouse osteosarcoma K7M3 (orthotopic) | **Nude мыши** Nude mice | **Увеличение выживаемости без полного излечения** Increased survival without complete cure | |
| | | **Глиома человека U87Fluc (подкожная, ортотопическая)** Human glioma U87Fluc (subcutaneous, orthotopic) | **Nude мыши** Nude mice | **Регресс опухоли** Tumour regression | [12] |
| | | **Аденокарцинома легких человека A549 (подкожная)** Human lung adenocarcinoma A549 (subcutaneous) | **Nude мыши** Nude mice | **Незначительная задержка в росте опухоли** Tumour growth delay | [24] |
| | A7(74) | **Глиома крысы BT4C (ортотопическая)** Rat glioma BT4C (orthotopic) | **Крысы BDIX** Rat BDIX | | |
| | | **Карцинома предстательной железы человека LNCaP (ортотопическая, подкожная)** Carcinoma of the human prostate LNCaP (orthotopic, subcutaneous) | **CANN мыши** CANN mice | **Регресс опухоли** Tumour regression | [30] |
| | SFV-AM6-124T | **Глиома мышей GL261 (ортотопическая)** Mouse glioma GL261 (orthotopic) | **C57BL/6NRj мыши** C57BL/6NRj mice | **Повышение активности фагоцитов и дендритных клеток, селективная репликация вируса, апоптотическая гибель клеток** Increased phagocyte and dendritic cell activity, selective viral replication, apoptotic cell death | [29] |
| | SFV4-miRT124 | **Глиома мышей CT-2A-Fluc (ортотопическая)** Mouse glioma CT-2A-Fluc (orthotopic) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | **Ингибирование роста опухоли, увеличение выживаемости, неврологические симптомы** Inhibited tumour growth, increased survival rate, neurological symptoms | [28] |
| SFV + VV | WT | **Эпителиальная карцинома яичника мышей MOSEC (внутрибрюшинная)** Epithelial carcinoma of the ovary in mice MOSEC (intraperitoneal) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | **Задержка в росте опухоли, длительная выживаемость** Delayed tumour growth, prolonged survival | [62] |
| | | **Глиома мышей DBT (подкожная)** Mouse glioma DBT (subcutaneous) | **BALB/c мыши** BALB/c mice | **Кратковременная задержка роста опухоли** Short-term delay in tumour growth | [53] |

**Окончание таблицы 1. Противоопухолевая эффективность альфавирусов**

Table 1. Antitumour efficiency of Alphaviruses (continued)

| Вирус Virus | Штамм Strain | Тип опухоли (модель) Tumour type (model) | Животная модель Animal model | Противоопухолевые эффекты Antitumour effects | Ссылка на исследование References |
|---|---|---|---|---|---|
| SIN | 1 | **Гепатома мыши ML-1 4a и ARKD (подкожная)** Mouse hepatoma ML-1 4a and ARKD (subcutaneous) | **BALB/c мыши** BALB/c mice | **Задержка роста опухоли; регресс опухоли; активация CD8⁺ и CD4⁺** Tumour growth inhibition, tumour regression CD8⁺ and CD4⁺ activation | [14] |
| | | **Гепатома мыши BNL (подкожная)** Mouse hepatoma BNL (subcutaneous) | | **Нет эффекта** No effect | |
| | AR339 | **Рак шейки матки человека HeLa и C33A (подкожная)** Human cervical cancer HeLa and C33A (subcutaneous) | **BALB/ cAnNcrj-nu/ nu мыши** BALB/ cAnNcrj-nu/ nu mice | **Регресс опухоли** Tumor regression | [51] |
| | | **Рак яичников человека (HOC-1, HAC-2 и OMC-3) (внутрибрюшинная)** Human ovarian cancer (HOC-1, HAC-2 and OMC-3) (intraperitoneal) | | **Подавление асцита** Ascites suppression | |
| | | **Глиобластома человека U-87 MG (подкожная)** Human glioblastoma U-87 MG (subcutaneous) | **CB.17 SCID мыши** CB.17 SCID mice | **Регресс опухоли** Tumor regression | [57] |
| | | **Нейробластома человека SK-N-SH, IMR-32 (подкожная)** Human neuroblastoma SK-N-SH, IMR-32 (subcutaneous) | **BALB/ cAnNcrj-nu/ nu мыши** BALB/ cAnNcrj-nu/ nu mice | **Регресс опухоли** Tumor regression | [46] |
| M1 | WT | **Гепатоцеллюлярная карцинома человека Hep3B (подкожная)** Human hepatocellular carcinoma Hep3B (subcutaneous) | **BALB/c-nu/ nu мыши** BALB/c-nu/ nu mice | **Задержка роста опухоли, избирательная репликация вируса в опухоли** Delayed tumor growth, selective intra-tumor viral replication | [23] |
| | | **Карцинома молочной железы мыши 4T1 (ортотопическая)** Mouse mammary gland carcinoma 4T1 (orthotopic) | **BALB/ мыши** BALB/ mice | | |
| | | **Меланома кожи мыши B16 (подкожная)** Mouse skin melanoma B16 (subcutaneous) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | | |
| | WT + Doxorubicin | **Рак молочной железы человека HCC1806, MDA-MB-468, MDA-MB-361 (подкожная)** Human breast cancer HCC1806, MDA-MB-468, MDA-MB-361 (subcutaneous) | **BALB/c-nu/ nu мыши** BALB/c-nu/ nu mice | **Ингибирование роста опухоли** Inhibition of tumor growth | [61] |
| | WT + NanoKnife | **Аденокарцинома поджелудочной железы мыши Pan02 (подкожная, ортотопическая)** Adenocarcinoma of the mouse pancreas Pan02 (subcutaneous, orthotopic) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | **Ингибирование роста опухоли, увеличение выживаемости** Inhibition of tumor growth, increased survival | [44] |

**Примечание.** SFV — вирус леса Семлики, VV — вирус коровьей оспы, SIN — Синдбис, M1 — штамм M1 вируса Гета, WT — дикий тип.
Note. SFV — Semliki Forest virus, VV — Vaccinia virus, SIN — Sindbis, M1 — Getha virus strain M1, WT — wild type.

кожной и ортотопической глиомой человека U87Fluc больших и малых размеров. При однократной инъекции SFV VA7-EGFP опухоли малых размеров регрессировали полностью, а большие опухоли уменьшались, каких-либо неврологических симптомов у мышей также не наблюдалось [12]. Авторы подчеркивают, что опухолевая клеточная линия U87Fluc чрезвычайно восприимчива к SFV VA7-EGFP и поэтому их исследование следует рассматривать как наилучший сценарий проявления онколитической активности данного вируса. Для лечения глиом также был протестирован вектор SFV-AM6SFV4 на основе вируса леса Семлики, в котором произведены аминокислотные замены в белках nsp3, nsp4 и E2. Данный вектор был разработан, чтобы решить проблему чувствительности SFV к интерферону 1 типа. В эксперименте *in vitro* на клеточной линии глиомы мышей GL261 вектор SFV-AM6SFV4 эффективно лизировал клетки, а при использовании мышиной модели C57BL/6NRj с ортотопической глиомой GL261 наблюдалось повышение активности фагоцитов и дендритных клеток, исходя из чего можно сделать вывод об иммуногенной гибели клеток. Также авторы продемонстрировали селективную репликацию вируса в клетках глиомы мыши GL261 и апоптотическую гибель клеток [29]. Другой генно-инженерный штамм SFV4-miRT124 проявлял сильную онколитическую активность *in vitro* в отношении мышиной астроцитомы CT-2A и в клеточных линиях глиобластомы человека, предварительно обработанных интерфероном 1 типа [28]. Далее SFV4-miRT124 тестировали *in vivo*, и у мышей C57BL/6 с ортотопической глиомой CT-2A-Fluc также наблюдался ответ на терапию — происходило ингибирование роста опухоли, повышалась выживаемость, и, в сравнении с SFV VA7-EGFP, эффект был более выражен, однако у мышей наблюдались явные неврологические симптомы [28]. Поэтому требуются дополнительные генетические модификации данного вектора для улучшения его профиля безопасности. В другом подходе для преодоления механизмов резистентности глиом к онколитическому вирусу SFV авторы применили его совместно с вирусом осповакцины (vaccinia virus, VV), который ранее показал эффективность в отношении глиом. Исследования в отношении подкожной глиомы мышей DBT не показали повышения эффективности при комбинированной терапии [53], однако в отношении эпителиальной карциномы яичников мышей MOSEC такая комбинированная терапия усилила противоопухолевые эффекты в сравнении с монотерапией только вирусом леса Семлики или вирусом коровьей оспы, что указывает на перспективность данного подхода для определенных типов опухолей [62].

### Вирус Синдбис

Вирус Синдбис впервые был выделен из комаров рода *Culex*, собранных в деревне Синдбис близ Каира в 1952 г. [20]. Вирус Синдбис может рассматриваться в качестве онколитического агента, так как не вызывает серьезных заболеваний у людей, способен эффективно заражать, лизировать опухолевые клетки и проникать в труднодоступные опухоли при системном введении [50]. SIN, как и SFV, чувствителен к интерферону и без генетических модификаций может быть использован только в опухолях дефектной передачей сигнала интерферона. Как доказательство чувствительности SIN к интерферону были проведены эксперименты на мышах с использованием клеточной линии гепатомы мышей ML-1 4a, которая частично дефектна по продукции IFNβ, но интактна по передаче сигналов интерферона. В результате при имплантации *in vivo* гепатома мышей ML-1 4a может продуцировать низкие уровни IFNβ, а также способна реагировать на интерферон, который секретируется окружающими нормальными клетками и, следовательно, вызывать противовирусный ответ, тем самым снижая эффективность терапии вирусом Синдбис [14]. Также в данном исследовании была использована клеточная линия ARKD со стабильным нокаутом рецептора интерферона на основе клеточной линии ML-1 4 и клеточная линия гепатомы мыши BNL, которая не имеет нарушений передачи сигнала интерферона. Необходимо подчеркнуть, что ARKD имеет в 5 раз меньший уровень экспресии рецептора интерферона IFNAR1 в сравнении с исходной клеточной линией ML-1 4a. При оценке онколитического действия SIN на опухолевых клеточных линиях ML-1 4a и ARKD *in vivo*, как и ожидалось, наблюдалось замедление роста опухоли и высокие уровни ее инфильтрации клетками $CD8^+$ и $CD4^+$, в то время как на опухоли BNL терапия не подействовала. Также отмечалось, что регресс опухолей ARKD был сильнее по сравнению с ML-1 4a. Таким образом, состояние интерферонового ответа имеет решающее значение для успеха виротерапии вирусом Синдбис на моделях *in vivo*. Следует также отметить, что SIN индуцирует цитотоксический противоопухолевый иммунитет, который сдерживает рост опухоли даже после выведения вируса [14]. Онколитический потенциал вируса Синдбис оценивали в сравнительной характеристике с реовирусом на клеточных линиях рака шейки матки (HeLaS3 и C33A) и рака яичников (HOC-1, HAC-2 и OMC-3). SIN показал большую эффективность в сравнении с реовирусом, а также не вызывал морфологических изменений в нетрансформированных кератиноцитах. Помимо этого, опухолевые клетки рака

шейки матки (HeLaS3 и C33A) вводили мышам BALB/cAnNcrj-nu/nu подкожно с последующей терапией посредством внутривенного введения вируса Синдбис, что приводило к значительной регрессии развившихся опухолей [51]. Аналогичный эффект был достигнут при внутрибрюшинном введении вируса бестимусным мышам CB.17 SCID с внутрибрюшинным раком яичников человека OMC-3 [51]. В другом исследовании [57] сравнивали онколитическую активность 9 разных вирусов в отношении клеточных линий глиобластом U-87 MG и M059J. Использовали вирусы везикулярного стоматита, Синдбис, псевдобешенства, аденоассоциированный вирус, мелкий вирус мышей (штаммы MVMi и MVMp), цитомегаловирус мыши, цитомегаловирус человека и вирус обезьян SV40. Вирусы везикулярного стоматита и Синдбис продемонстрировали сильное цитолитическое действие, высокую скорость репликации на клеточной культуре U-87 MG, однако вирус Синдбис не инфицировал клетки M059J, в то время как вирус везикулярного стоматита эффективно лизировал клетки обеих культур. Также SIN проявлял селективность в отношении опухолевых клеток при сокультивировании глиобластомы и фибробластов. В экспериментах на подкожной модели глиобластомы U-87 MG SIN также приводил к цитолизу клеток опухоли, как и в эксперименте на клеточных линиях *in vitro*. Исходя из полученных результатов можно предположить, что SIN является хорошим кандидатом для лечения глиобластомы, однако без генетических модификаций весьма ограничен в использовании. При оценке вируса Синдбис для лечения нейробластом на бестимусных мышах BALB/cAnNcrj-nu/nu был показан полный регресс в течение 3–8 недель опухолей нейробластомы SK-N-SH и регресс 5 из 6 опухолей нейробластомы IMR-32 в течение 7–10 недель после терапии SIN, а также выживаемость в течение года после лечения тех мышей, у которых наблюдалась полная элиминация опухолей [46].

### Вирус Гета

Альфавирус M1 — это штамм вируса Гета, который был выделен из комаров вида *Culex*, собранных на острове Хайнань в Китае в 1960-х гг. [56]. Вирус поражает в основном лошадей и свиней и не является патогенным для человека [7]. Альфавирус M1 индуцирует апоптоз в клетках глиомы за счет стресса энодоплазматического ретикулума [13] и реплицируется селективно в опухолевых клетках, не вызывая токсических эффектов [23, 59]. В доклинических испытаниях на моделях гепатоцеллюлярной карциномы Hep3B, рака молочной железы мыши 4T1 и меланомы кожи мыши B16 наблюдались очевидные противоопухолевые эффекты, не было отмечено токсических эффектов и репликации вируса в здоровых тканях. Также была установлена чувствительность альфавируса M1 к противовирусному белку с цинковыми пальцами (Zinc-finger antiviral protein, ZAP), который способен взаимодействовать с вирусной мРНК, подавляя тем самым трансляцию вирусных белков. Дефицит ZAP часто встречается в злокачественных новообразованиях и, вероятно, этот факт является одним из основных факторов селективной репродукции альфавируса M1 в опухолевых клетках [23]. В других исследованиях [60] было продемонстрировано, что при трижды негативном раке молочной железы (Triple-negative breast cancer, TNBC) альфавирус M1 индуцирует некроптоз, а не апоптоз, как в случае глиомы. Также было выявлено, что доксорубицин повышает чувствительность TNBC к альфавирусу M1, однако в других опухолевых клеточных линиях доксорубицин не усиливал действие вируса, что позволяет применять альфавирус M1 в комбинированной терапии с доксорубицином только для лечения TNBC [60]. Существуют и другие исследования применения комбинированной терапии с альфавирусом M1. Так, для аденокарциномы поджелудочной железы PAN02 было предложено использовать терапию альфавирусом M1 с необратимой электропорацией NanoKnife, которая способствовала инфицированию вирусом опухолевых клеток, что приводило к выраженному противоопухолевому эффекту [44].

## Альфавирусы как иммуномодулирующие агенты

Альфавирусы и векторы на их основе способны активировать противоопухолевый иммунитет, то есть могут рассматриваться как агенты для иммунотерапии злокачественных новообразований (табл. 2). Например, при терапии неходжкинской B-клеточной лимфомы A20, инокулированной мышам BALB/c, были использованы векторы на основе вируса Синбис с дефектом репликации в сочетании с моноклональными антителами α4–1BB Ab. Такая комбинированная терапия, в отличие от монотерапии, приводила к полному регрессу опухоли. Лизис опухоли способствовал синергетическим эффектам: повышению цитотоксичности T-лимфоцитов, продукции IFNγ, пролиферации, миграции T-лимфоцитов. Кроме того, у всех выживших мышей развивался противоопухолевый иммунитет, что вызывало отторжение лимфомы A20 при ее повторном введении мышам [58].

Одной из стратегий активации противоопухолевого иммунитета является вставка в геном он-

колитического вируса различных терапевтических генов, например генов, кодирующих опухоль-ассоциированные или чужеродные антигены, которые распознаются иммунной системой и индуцируют опосредованный Т-лимфоцитами иммунный ответ на опухоль. Было показано, что векторы на основе вируса Синдбис (SV-LacZ), несущие β-галактозидазу LacZ, ингибировали рост мышиной карциномы толстой кишки CT26, экспрессирующую LacZ, вызывали ремиссию опухоли и активировали цитотоксические $CD8^+$. При этом вирус Синдбис без генетических вставок оказывал незначительное терапевтическое действие в отношении опухолевых клеток CT26. Этот эффект связан с иммунным ответом на чужеродный антиген LacZ. Также следует сказать о формировании Т-клеток памяти, которые в дальнейшем активировали иммунный ответ при повторном введении SV-LacZ как в отношении опухолевых клеток карциномы толстой кишки CT26, экспрессирующих LacZ, так и в отношении LacZ-негативных опухолевых клеток [10, 49]. Кроме того, на модели карциномы яичников человека ES-2 было показано, что SV-LacZ активирует NK-клетки [9]. В другом исследовании [38] был разработан вектор на основе вируса Синдбис (SV-NYESO-1) с использованием опухоль-ассоциированного антигена рака яичка человека NYESO-1, который экспрессируется при раке яичников примерно в 43% случаев [8]. Онколитическую активность вектора SV-NYESO-1 проверяли на мышах BALB/C с использованием опухолевых клеток карциномы толстой кишки, экспрессирующих NYESO-1 [38]. Были отмечены задержка роста опухоли, иммуномодулирующее действие вектора и, в некоторых случаях, полный регресс опухолей. Было отмечено, что лечение SV-NYESO-1 приводило к увеличению экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках и PD-1 — на инфильтрирующих опухоль Т-клетках. Поэтому для усиления противоопухолевых эффектов SV-NYESO-1 была применена комбинированная терапия с блокатором иммунных контрольных точек anti-PD-1, что привело к более сильному противоопухолевому иммунному ответу, к полному исчезновению опухолей практически у всех мышей, а также к формированию противоопухолевого иммунитета [38]. При использовании вектора SFV-OVA, кодирующего овальбуминовый антиген (Ovalbumin, OVA), который является высокоиммуногенным чужеродным антигеном, в комбинированной терапии с VV-OVA на модели карциномы яичников мыши MOSEC наблюдались более выраженные противоопухолевые эффекты, чем при использовании диких штаммов SFV и VV. Противоопухолевые эффекты включали уменьшение объема опухоли и длительную выживаемость мышей C57BL/6 за счет прямого онколитического действия вирусов на опухоль, а также за счет активации OVA-специфических $CD8^+$ [62].

Для противоопухолевой терапии у мышей с подкожной мышиной лимфобластомой TC-1 использовали вектор SFV-IFN на основе вируса леса Семлики, экспрессирующий мышиный IFNα [33]. SFV-IFN был способен индуцировать ответ цитотоксических Т-лимфоцитов и активировать миелоидные клетки. Внутриопухолевое введение SFV-IFN приводило к лизису 58% привитых опухолей в течение 21 дня. SFV-IFN также был способен индуцировать значительный противоопухолевый ответ в подкожной мышиной модели аденокарцимомы толстой кишки [33].

В настоящее время активно исследуются противоопухолевые свойства векторов, кодирующих интерлейкины, в том числе IL-12, который участвует в дифференцировке Т-клеток и стимулирует выработку фактора некроза опухоли, что делает его важным компонентом противоопухолевого иммунного ответа. В исследовании [48] в течение 5 дней после внутрибрюшинного введения вектора SIN/IL-12 мышам CB-17-SCID с карциномой яичников ES-2 детектировали уменьшение опухолей на 95%. Также было установлено, что терапевтический эффект SIN/IL12 зависит как от цитотоксической, так и от регуляторной функций NK-клеток [9]. На основе вируса леса Семлики также был создан вектор с геном, кодирующим IL-12 (SFV-enhIL-12), и введение его суркам *Marmota monax* с гепатоцеллюлярной карциномой приводило к активации интерферонов и Т-клеточного иммунного ответа, что способствовало уменьшению объема опухолей [36]. Внутриопухолевое введение вектора SFV-IL-12 крысам Fischer 344 с глиомой RG2 в дозах $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^8$ частиц в 5 мкл приводило к уменьшению объема опухоли на 70 и 87% соответственно. При этом введение низкой дозы вируса-вектора значительно увеличивало время выживания крыс, а высокая доза в некоторых случаях была летальна, что, по-видимому, было результатом воспаления, некроза или отека в месте инокуляции [35]. В другом исследовании также было показано, что SFV-IL-12 активирует Т-лимфоциты, и усиливает экспрессию OX40 (один из рецепторов фактора некроза опухоли, который участвует в пролиферации Т-лимфоцитов) на CD4 Т-эффекторных клетках, и при комбинированной терапии с применением антител-агонистов anti-OX40, способных активировать рецептор OX40, наблюдался регресс опухолей [39].

Следует отметить, что для использования в онкоиммунотерапии активно исследуются векторы на основе VEE, и на данный момент уже есть данные клинических исследований по применению таких векторов [31]. AVX701 представляет собой вектор на основе VEE с дефектом репликации (virus replicon particles, VRP),

**Таблица 2. Иммуноопосредованная противоопухолевая эффективность альфавирусов**
Table 2. Immune-mediated antitumour Alphavirus efficacy

| Вирус Virus | Трансген Transgene | Комбинированная терапия Combination therapy | Тип опухоли (модель) Tumour type (model) | Животная модель Animal model | Противоопухолевые эффекты Antitumour effects | Ссылка на исследование References |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SIN | – | **Моноклональные антитела α4–1BB Ab** Monoclonal antibody α4–1BB Ab | **Неходжкинская В-клеточная лимфома A20 мыши (внутрибрюшинная)** Mouse non-Hodgkin's B-cell lymphoma A20 (intraperitoneal) | **BALB/C мыши** BALB/C mice | **Полный регресс опухоли, продукция IFNγ, активация Т-клеток, усиление противоопухолевого иммунитета** Total tumor regression, IFNγ production, T-cell activation, increased anti-tumor immunity | [58] |
| SIN | LacZ | – | **Карцинома толстой кишки мыши CT26 (подкожная, внутрибрюшинная)** CT26 mouse colon carcinoma (subcutaneous, intraperitoneal) | **BALB/C мыши** BALB/C mice | **Ингибирование роста опухоли, активация $CD8^+$** Inhibited tumor growth, $CD8^+$ activation | [10] |
| SIN | LacZ | – | **Карцинома яичников человека ES-2 (внутрибрюшинная)** Human ovarian carcinoma ES-2 (intraperitoneal) | **CB-17-SCID мыши** CB-17-SCID mice | **Активация NK-клеток** NK cell activation | [9] |
| SIN | NYESO-1 | **anti-PD-1** | **Карцинома толстой кишки мыши CT26. Fluc.NYESO1 (внутрибрюшинная)** Mouse colon carcinoma CT26.Fluc.NYESO1 (intraperitoneal) | **BALB/C мыши** BALB/C mice | **Полный регресс опухоли, инфильтрация Т-клеток в опухолях, продукция IFNγ, индукция экспрессии PD-L1 и PD-1, развитие противоопухолевого иммунитета** Tumor regression, T-cell infiltration, IFNγ production induction of PD-L1 and PD-1 expression, increased antitumor immunity | [38] |
| SIN | IL-12 | – | **Карцинома яичников человека ES-2 (внутрибрюшинная)** Human ovarian carcinoma ES-2 (intraperitoneal) | **CB-17-SCID мыши** CB-17-SCID mice | **Активация Т- и NK-клеток** Activation of T and NK cells | [11, 48] |
| SFV | IFNα | – | **Лимфобластома мыши TC-1 (подкожная)** Mouse TS-1 lymphoblastoma (subcutaneous) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | **Активация миелоидных клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, регресс опухолей, развитие противоопухолевого иммунитета** Activation of myeloid cells, cytotoxic T lymphocytes, tumor regression, development of antitumor immunity | [33] |
| SFV | IL-12 | – | **Гепатоцеллюлярная карцинома (индуцированная)** Hepatocellular carcinoma (induced) | **Сурки *Marmota monax*** *Marmota monax* marmots | **Активация IFN I и II, Т-клеток, ремиссия опухоли** Activation of type I and II IFNs, T cells, tumor remission | [36] |

| Вирус Virus | Трансген Transgene | Комбинированная терапия Combination therapy | Тип опухоли (модель) Tumour type (model) | Животная модель Animal model | Противоопухолевые эффекты Antitumour effects | Ссылка на исследование References |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SFV | IL-12 | – | **Глиома крысы RG2 (ортотопическая)** Rat glioma RG2 (orthotopic) | **Крысы Fischer 344** Fischer 344 rats | **Уменьшение объема опухоли, увеличение выживаемости, смертельная патология в виде воспаления и отека** Reduced tumor volume, increased survival, lethal pathology in the form of inflammation and edema | [35] |
| | | anti-OX40 | **Карцинома толстой кишки мыши CT26, карцинома предстательной железы мыши MyC-CaP (внутрибрюшинная)** CT26 mouse colon carcinoma, MyC-CaP mouse prostate carcinoma (intraperitoneal) | **BALB/c, FVB/NJ мыши** BALB/c, FVB/NJ мыши | **Активация Т-клеток, регресс опухолей, снижение риска развития резистентности опухоли** T-cell activation, tumor regression, reducing the risk of tumor resistance | [39] |
| SFV + VV | OVA | – | **Эпителиальная карцинома яичника мышей MOSEC (внутрибрюшинная)** Epithelial carcinoma of the mouse ovary, MOSEC (intraperitoneal) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | **Уменьшение объема опухоли, длительная выживаемость, активация OVA-специфических CD8⁺** Reduced tumor volume, long-term survival, activation of OVA-specific CD8⁺ | [62] |
| VEE (VRP) | IL-12, CEA | – | **Аденокарцинома толстой кишки мыши MC38-CEA-2** Mouse colon adenocarcinoma MC38-CEA-2 | **C57BL/6 Мыши C57BL/6 mice** | **Активация CEA-специфического Т-клеточного ответа** Activation of a CEA-specific T-cell response | [32] |
| | CEA | – | **Колоректальный рак (клинические испытания)** Colorectal cancer (clinical trials) | – | **Активация CEA-специфического Т-клеточного ответа, длительная выживаемость** Activation of CEA-specific T-cell response, long-term survival rate | [31] |
| | HER2 | – | **Рак молочной железы со сверхэкспрессией HER2 (ортотопическая, клинические испытания)** Breast cancer with HER2 overexpression (orthotopic, clinical trials) | **BALB/c Мыши** BALB/c mice | **Регресс опухолей, развитие противоопухолевого иммунитета** Tumor regression, activation of anti-tumor immunity | [5] |
| | **Белки вируса папилломы человека 16 типа E6 и E7** Human papillomavirus type 16 proteins E6 and E7 | – | **Лимфобластома мыши TC-1 (подкожная)** Mouse lymphoblastoma TC-1 (subcutaneous) | **C57BL/6 мыши** C57BL/6 mice | **Развитие противоопухолевого иммунитета** Developing anti-tumor immunity | [4] |

**Примечание**. SIN — Синдбис, SFV — вирус леса Семлики, VV — вирус коровьей оспы, VEE — вирус Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, VRP — вирусные частицы репликона с дефектом репликации, LacZ — β-галактозидаза, NYESO-1 — опухоль-ассоциированный антиген рака яичка человека; OVA — овальбуминовый антиген, CEA — карциноэмбриональный антиген, HER2 — рецептор 2 эпидермального фактора роста человека.

Note. SIN — Sindbis, SFV — Semliki Forest virus, VV — vaccinia virus, VEE — Venezuelan equine encephalitis virus, VRP — virus replicon particles, LacZ — β-galactosidase, NYESO-1 — tumor-associated human testicular cancer antigen, OVA — ovalbumin antigen, CEA — carcinoembryonic antigen, HER2 — human epidermal growth factor receptor 2.

кодирующий карциноэмбриональный антиген CEA, который является биомаркером опухоли для колоректального и некоторых других видов рака [11]. Данный вектор был протестирован в первой фазе клинических исследований на пациентах с колоректальным раком. Активация Т-лимфоцитов после введения AVX701 приводила к более длительному выживанию пациентов, однако не к полному излечению. В будущем исследователи планируют повысить эффективность терапии, комбинируя AVX701 с блокаторами иммунных контрольных точек [31]. В других доклинических исследованиях на мышах с опухолями аденокарциномы толстой кишки MC38-CEA-2 вирус-вектор AVX701 при применении в комбинированной терапии с вектором VRP-IL-12, кодирующим IL-12, показал более сильную активацию CEA-специфического Т-клеточного ответа в сравнении с монотерапией [32]. Также на основе VRP был разработан вектор VRP-HER2, кодирующий домены рецептора эпидермального фактора роста HER2, который гиперэкспрессируется в 20–30% случаев рака молочной железы и связан с более агрессивным поведением опухоли. VRP-HER2 был протестирован в доклинических исследованиях на мышах, при этом в ответ на терапию авторы наблюдали индукцию HER2-специфических Т-клеток и антител, которые ингибировали рост опухоли. Также VRP-HER2 был протестирован в первой фазе клинических исследований, в которых первая группа пациентов со злокачественными новообразованиями со сверхэкспрессией HER2 получала 3 дозы VRP-HER2 в течение 6 недель. Во второй группе пациенты получили те же 3 дозы совместно с зарегистрированными препаратами против HER2-положительного рака молочной железы, такими как моноклональные антитела Pertuzumab, Trastuzumab или препараты TDM-1 и Lapatinib. В первой группе выживаемость без прогрессирования составила 1,8 месяца, а общая выживаемость — 50,2 месяца, во второй группе — 3,6 и 32,7 месяцев соответственно. Также следует отметить, что VRP-HER2 хорошо переносился пациентами, и вакцинация индуцировала HER2-специфические Т-клетки и антитела. В дальнейшем авторы планируют продолжить испытания с блокаторами иммунных контрольных точек [5]. В другой работе [4] авторы разработали вектор на основе VEE, кодирующий гены белков вируса E6 и E7 папиломы человека 16 типа. Белки E6 и E7 способны инактивировать белки-супрессоры опухолевого роста Rb и P53, тем самым способствуя развитию опухоли. В разработанном векторе аминокислотные последовательности белков E6 и E7 были изменены в четырех/пяти местах для инактивации их онкогенного потенциала. Вакцинация мышей полученным вектором с последующим введением клеточной линии лимфобластомы TC-1 или опухолевой клеточной линии C3 защищала животных от развития опухоли на 100 и 90% соответственно благодаря действию Т-лимфоцитов, специфичных в отношении антигенов E6 и E7. Также авторы доказали безопасность этого вектора, предоставив данные по уровням экспрессии белков P53 и Rb [4].

## Заключение

Таким образом, альфавирусы продемонстрировали потенциал для применения в противоопухолевой терапии. Широкий тропизм позволяет использовать их для лизиса опухолей различной этиологии, при этом селективность альфавирусов и векторов на их основе к репликации в опухолевых клетках определяется внутриклеточными факторами. Следует отметить эффективность альфавирусов и векторов на их основе в качестве противоопухолевых иммуномодулирующих агентов как в монотерапии, так и в комбинированной терапии. Альфавирусы способны не только вызывать иммунный ответ непосредственно после введения, но также индуцировать формирование противоопухолевого иммунитета, защищающего организм от повторного развития злокачественного новообразования. Помимо этого, альфавирусы представляют собой удобную платформу для разработки векторов, экспрессирующих различные целевые белки для комплексной борьбы с опухолями. Простое и быстрое получение рекомбинантных частиц с высоким титром, а также быстрая репликация РНК без риска интеграции ее в геном делают альфавирусные векторы привлекательными в качестве онколитических, однако зачастую они обеспечивают только временную экспрессию трансгена, закодированного в геноме. С другой стороны временная экспрессия может быть достоинством, так как в этом случае иммунногенность альфавирусов, как правило, невысокая, что позволяет вводить вирус системно в кровоток без риска его инактивации иммунной системой. Также следует отметить, что на данный момент количество проведенных или запланированных клинических испытаний с применением альфавирусных конструкций невелико, и, согласно базе PubMed, опубликовано в десять раз больше исследований в области иммунотерапии опухолей для аденовирусов, чем для альфавирусов. Однако, хотя серьезных прорывов пока не наблюдается, проведенные исследования подтвердили безопасность введения альфавирусов человеку и наличие у них выраженных противоопухолевых эффектов. В целом альфавирусы и векторы на их основе являются перспективными противоопухолевыми агентами.

## Список литературы/References


1. Alberts P., Tilgase A., Rasa A., Bandere K., Venskus D. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: The Rigvir® story. *Eur. J. Pharmacol., 2018, vol. 837, pp. 117–126. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.042*
2. Al-Saleh W., Delvenne P., Brule F.A., Menard S., Boniver J., Castronovo V. Expression of the 67 KD laminin receptor in human cervical preneoplastic and neoplastic squamous epithelial lesions: an immunohistochemical study. *J. Pathol. Clin. Res., 1997, vol. 181, pp. 287–293. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199703)181:3<287::AID-PATH762>3.0.CO;2-W*
3. Bradish C.J., Allner K., Maber H.B. The virulence of original and derived strains of Semliki Forest virus for mice, guinea-pigs and rabbits. *J. Gen. Virol., 1971, vol. 12, pp. 141–160. doi: 10.1099/0022-1317-12-2-141*
4. Cassetti M.C., McElhiney S.P., Shahabi V., Pullen J.K., Le Poole I.C., Eiben G.L., Smith L.R., Kast W.M. Antitumor efficacy of Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles encoding mutated HPV16 E6 and E7 genes. *Vaccine, 2004, vol. 22, pp. 520–527. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.07.003*
5. Crosby E.J., Gwin W., Blackwell K., Marcom P.K., Chang S., Maecker H.T., Broadwater G., Hyslop T., Kim S., Rogatko A., Lubkov V., Snyder J.C., Osada T., Hobeika A.C., Morse M.A., Lyerly H.K., Hartman Z.C. Vaccine-induced memory CD8⁺ T cells provide clinical benefit in HER2 expressing breast cancer: a mouse to human translational study. *Clin. Cancer Res., 2019, vol. 25, pp. 2725–2736. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3102*
6. Frampton J.E. Teserpaturev/G47Δ: first approval. *BioDrugs, 2022, vol. 36, pp. 667–672. doi: 10.1007/s40259-022-00553-7*
7. Fukunaga Y., Kumanomido T., Kamada M. Getah virus as an equine pathogen. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 2000, vol. 16, pp. 605–617. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30099-8*
8. Gnjatic S., Nishikawa H., Jungbluth A.A., Güre A.O., Ritter G., Jäger E., Knuth A., Chen Y.-T., Old L.J. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv. Cancer Res., 2006, vol. 95, pp. 1–30. doi: 10.1016/S0065-230X(06)95001-5*
9. Granot T., Venticinque L., Tseng J.-C., Meruelo D. Activation of cytotoxic and regulatory functions of NK cells by Sindbis viral vectors. *PLoS One, 2011, vol. 6: e20598. doi: 10.1371/journal.pone.0020598*
10. Granot T., Yamanashi Y., Meruelo D. Sindbis viral vectors transiently deliver tumor-associated antigens to lymph nodes and elicit diversified antitumor CD8⁺ T-cell immunity. *Mol. Ther., 2014, vol. 22, pp. 112–122. doi: 10.1038/mt.2013.215*
11. Hasanzadeh M., Shadjou N., Lin Y., de la Guardia M. Nanomaterials for use in immunosensing of carcinoembryonic antigen (CEA): recent advances. *Trends Analyt. Chem., 2017, vol. 86, pp. 185–205. doi: 10.1016/j.trac.2016.11.003*
12. Heikkilä J.E., Vähä-Koskela M.J.V., Ruotsalainen J.J., Martikainen M.W., Stanford M.M., McCart J.A., Bell J.C., Hinkkanen A.E. Intravenously administered Alphavirus vector VA7 eradicates orthotopic human glioma xenografts in nude mice. *PLoS One, 2010, vol. 5: e8603. doi: 10.1371/journal.pone.0008603*
13. Hu J., Cai X.F., Yan G. Alphavirus M1 induces apoptosis of malignant glioma cells via downregulation and nucleolar translocation of p21WAF1/CIP1 protein. *Cell Cycle, 2009, vol. 8, pp. 3328–3339. doi: 10.4161/cc.8.20.9832*
14. Huang P.Y., Guo J.H., Hwang L.H. Oncolytic Sindbis virus targets tumors defective in the interferon response and induces significant bystander antitumor immunity in vivo. *Mol. Ther., 2012, vol. 20, pp. 298–305. doi: 10.1038/mt.2011.245*
15. Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov., 2015, vol. 14, pp. 642–662. doi: 10.1038/nrd4663*
16. Kaufman H.L., Shalhout S.Z., Iodice G. Talimogene laherparepvec: moving from first-in-class to best-in-class. *Front. Mol. Biosci., 2022, vol. 9: 834841. doi: 10.3389/fmolb.2022.834841*
17. Kelly E., Russell S.J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol. Ther., 2007, vol. 15, pp. 651–659. doi: 10.1038/sj.mt.6300108*
18. Ketola A., Hinkkanen A., Yongabi F., Furu P., Määttä A.M., Liimatainen T., Pirinen R., Björn M., Hakkarainen T., Mäkinen K., Wahlfors J., Pellinen R. Oncolytic Semliki Forest virus vector as a novel candidate against unresectable osteosarcoma. *Cancer Res., 2008, vol. 68, pp. 8342–8350. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0251*
19. Klimstra W.B., Nangle E.M., Smith M.S., Yurochko A.D., Ryman K.D. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for Alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J. Virol., 2003, vol. 77, pp. 12022–12032. doi: 10.1128/jvi.77.22.12022-12032.2003*
20. Laine M., Luukkainen R., Toivanen A. Sindbis viruses and other Alphaviruses as cause of human arthritic disease. *J. Int. Med., 2004, vol. 256, pp. 457–471. doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01413.x*
21. Leung J.Y.-S., Ng M.M.-L., Chu J.J.-H. Replication of Alphaviruses: a review on the entry process of Alphaviruses into cells. *Adv. Virol., 2011, vol. 2011: e249640. doi: 10.1155/2011/249640*
22. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Curr. Cancer Drug Targets, 2018, vol. 18, pp. 171–176. doi: 10.2174/1568009618666171129221503*
23. Lin Y., Zhang H., Liang J., Li K., Zhu W., Fu L., Wang F., Zheng X., Shi H., Wu S., Xiao X., Chen L., Tang L., Yan M., Yang X., Tan Y., Qiu P., Huang Y., Yin W., Su X., Hu H., Hu J., Yan G. Identification and characterization of Alphavirus M1 as a selective oncolytic virus targeting ZAP-defective human cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2014, vol. 111, pp. e4504–e4512. doi: 10.1073/pnas.1408759111*
24. Määttä A.-M., Liimatainen T., Wahlfors T., Wirth T., Vähä-Koskela M., Jansson L., Valonen P., Häkkinen K., Rautsi O., Pellinen R., Mäkinen K., Hakumäki J., Hinkkanen A., Wahlfors J. Evaluation of cancer virotherapy with attenuated replicative Semliki Forest virus in different rodent tumor models. *Int. J. Cancer, 2007, vol. 121, pp. 863–870. doi: 10.1002/ijc.22758*
25. Määttä A.-M., Mäkinen K., Ketola A., Liimatainen T., Yongabi F.N., Vähä-Koskela M., Pirinen R., Rautsi O., Pellinen R., Hinkkanen A., Wahlfors J. Replication competent Semliki Forest virus prolongs survival in experimental lung cancer. *Int. J. Cancer, 2008, vol. 123, pp. 1704–1711. doi: 10.1002/ijc.23646*
26. Malfitano A.M., Di Somma S., Iannuzzi C.A., Pentimalli F., Portella G. Virotherapy: from single agents to combinatorial treatments. *Biochem. Pharmacol., 2020, vol. 177: e113986. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113986*
27. Markoff L. *Alphaviruses* (Chikungunya, Eastern Equine Encephalitis). In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. *Elsevier, Inc., 2020. Chapter 151: 1997-2006.e4*
28. Martikainen M., Niittykoski M., von und zu Fraunberg M., Immonen A., Koponen S., van Geenen M., Vähä-Koskela M., Ylösmäki E., Jääskeläinen J.E., Saksela K., Hinkkanen A. MicroRNA-attenuated clone of virulent Semliki Forest virus overcomes antiviral type I interferon in resistant mouse CT-2A glioma. *J. Virol., 2015, vol. 89, pp. 10637–10647. doi: 10.1128/JVI.01868-15*

29. Martikainen M., Ramachandran M., Lugano R., Ma J., Martikainen M.-M., Dimberg A., Yu D., Merits A., Essand M. IFN-I-tolerant oncolytic Semliki Forest virus in combination with anti-PD1 enhances T cell response against mouse glioma. *Mol. Ther. Oncolytics, 2021, vol. 21, pp. 37–46. doi: 10.1016/j.omto.2021.03.008*
30. Martikainen M., Ruotsalainen J., Tuomela J., Härkönen P., Essand M., Heikkilä J., Hinkkanen A. Oncolytic Alphavirus SFV-VA7 efficiently eradicates subcutaneous and orthotopic human prostate tumours in mice. *Br. J. Cancer, 2017, vol. 117, pp. 51–55. doi: 10.1038/bjc.2017.151*
31. Morse M.A., Hobeika A., Gwin W., Osada T., Gelles J., Rushing C., Niedzwiecki D., Lyerly H.K. Phase I study of alphaviral vector (AVX701) in colorectal cancer patients: comparison of immune responses in stage III and stage IV patients. *J. Immunother. Cancer, 2015, vol. 3: 444. doi: 10.1186/2051-1426-3-S2-P444*
32. Osada T., Berglund P., Morse M.A., Hubby B., Lewis W., Niedzwiecki D., Yang X.Y., Hobeika A., Burnett B., Devi G.R., Clay T.M., Smith J., Kim Lyerly H. Co-delivery of antigen and IL-12 by Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles enhances antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Cancer Immunol. Immunother., 2012, vol. 61, pp. 1941–1951. doi: 10.1007/s00262-012-1248-y*
33. Quetglas J.I., Fioravanti J., Ardaiz N., Medina-Echeverz J., Baraibar I., Prieto J., Smerdou C., Berraondo P. A Semliki Forest virus vector engineered to express IFNα induces efficient elimination of established tumors. *Gene Ther., 2012, vol. 19, pp. 271–278. doi: 10.1038/gt.2011.99*
34. Ramsey J., Mukhopadhyay S. Disentangling the frames, the state of research on the Alphavirus 6K and TF proteins. *Viruses, 2017, vol. 9: 228. doi: 10.3390/v9080228*
35. Roche F.P., Sheahan B.J., O'Mara S.M., Atkins G.J. Semliki Forest virus-mediated gene therapy of the RG2 rat glioma. *Neuropathol. Appl. Neurobiol., 2010, vol. 36, pp. 648–660. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01110.x*
36. Rodriguez-Madoz J.R., Liu K.H., Quetglas J.I., Ruiz-Guillen M., Otano I., Crettaz J., Butler S.D., Bellezza C.A., Dykes N.L., Tennant B.C., Prieto J., González-Aseguinolaza G., Smerdou C., Menne S. Semliki Forest virus expressing interleukin-12 induces antiviral and antitumoral responses in woodchucks with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *J. Virol., 2009, vol. 83, pp. 12266–12278. doi: 10.1128/JVI.01597-09*
37. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev., 2001, vol. 14, pp. 778–809. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001*
38. Scherwitzl I., Hurtado A., Pierce C.M., Vogt S., Pampeno C., Meruelo D. Systemically administered sindbis virus in combination with immune checkpoint blockade induces curative anti-tumor immunity. *Mol. Ther. Oncolytics., 2018, vol. 9, pp. 51–63. doi: 10.1016/j.omto.2018.04.004*
39. Scherwitzl I., Opp S., Hurtado A.M., Pampeno C., Loomis C., Kannan K., Yu M., Meruelo D. Sindbis virus with anti-OX40 overcomes the immunosuppressive tumor microenvironment of low-immunogenic tumors. *Mol. Ther. Oncolytics., 2020, vol. 17, pp. 431–447. doi: 10.1016/j.omto.2020.04.012*
40. Skidmore A.M., Bradfute S.B. The life cycle of the Alphaviruses: from an antiviral perspective. *Antiviral Res., 2023, vol. 209: e105476. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105476*
41. Smit J.M., Waarts B.-L., Kimata K., Klimstra W.B., Bittman R., Wilschut J. Adaptation of Alphaviruses to heparan sulfate: interaction of Sindbis and Semliki Forest viruses with liposomes containing lipid-conjugated heparin. *J. Virol., 2002, vol. 76, pp. 10128–10137. doi: 10.1128/jvi.76.20.10128-10137.2002*
42. Strauss J.H., Strauss E.G. The Alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev., 1994, vol. 58, pp. 491–562. doi: 10.1128/mr.58.3.491-562.1994*
43. Strauss J.H., Strauss E.G. Virus evolution: how does an enveloped virus make a regular structure? *Cell, 2001, vol. 105, pp. 5–8. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00291-4*
44. Sun S., Liu Y., He C., Hu W., Liu W., Huang X., Wu J., Xie F., Chen C., Wang J., Lin Y., Zhu W., Yan G., Cai J., Li S. Combining NanoKnife with M1 oncolytic virus enhances anticancer activity in pancreatic cancer. *Cancer Lett., 2021, vol. 502, pp. 9–24. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.018*
45. Suomalainen M., Liljeström P., Garoff H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of Alphaviruses. *J. Virol., 1992, vol. 66, pp. 4737–4747. doi: 10.1128/JVI.66.8.4737-4747.1992*
46. Takenouchi A., Saito K., Saito E., Saito T., Hishiki T., Matsunaga T., Isegawa N., Yoshida H., Ohnuma N., Shirasawa H. Oncolytic viral therapy for neuroblastoma cells with Sindbis virus AR339 strain. *Pediatr. Surg. Int., 2015, vol. 31, pp. 1151–1159. doi: 10.1007/s00383-015-3784-y*
47. Tian Y., Xie D., Yang L. Engineering strategies to enhance oncolytic viruses in cancer immunotherapy. *Signal Transduct. Target Ther., 2022, vol. 7: 117. doi: 10.1038/s41392-022-00951-x*
48. Tseng J.-C., Hurtado A., Yee H., Levin B., Boivin C., Benet M., Blank S.V., Pellicer A., Meruelo D. Using sindbis viral vectors for specific detection and suppression of advanced ovarian cancer in animal models. *Cancer Res., 2004, vol. 64, pp. 6684–6692. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1924*
49. Tseng J.-C., Levin B., Hirano T., Yee H., Pampeno C., Meruelo D. In vivo antitumor activity of sindbis viral vectors. *J. Natl Cancer Inst., 2002, vol. 94, pp. 1790–1802. doi: 10.1093/jnci/94.23.1790*
50. Tseng J.-C., Levin B., Hurtado A., Yee H., de Castro I.P., Jimenez M., Shamamian P., Jin R., Novick R.P., Pellicer A., Meruelo D. Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vectors. *Nat. Biotechnol., 2004, vol. 22, pp. 70–77. doi: 10.1038/nbt917*
51. Unno Y., Shino Y., Kondo F., Igarashi N., Wang G., Shimura R., Yamaguchi T., Asano T., Saisho H., Sekiya S., Shirasawa H. Oncolytic viral therapy for cervical and ovarian cancer cells by Sindbis virus AR339 strain. *Clin. Cancer Res., 2005, vol. 11, pp. 4553–4560. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2610*
52. Vähä-Koskela M.J.V., Kallio J.P., Jansson L.C., Heikkilä J.E., Zakhartchenko V.A., Kallajoki M.A. Kähäri V.-M., Hinkkanen A.E. Oncolytic capacity of attenuated replicative semliki forest virus in human melanoma xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res., 2006, vol. 66, pp. 7185–7194. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2214*
53. Vähä-Koskela M.J.V., Le Boeuf F., Lemay C., De Silva N., Diallo J.-S., Cox J., Becker M., Choi Y., Ananth A., Sellers C., Breton S., Roy D., Falls T., Brun J., Hemminki A., Hinkkanen A., Bell J.C. Resistance to two heterologous neurotropic oncolytic viruses, Semliki Forest virus and vaccinia virus, in experimental glioma. *J. Virol., 2013, vol. 87, pp. 2363–2366. doi: 10.1128/JVI.01609-12*

54. Van den Brûle F.A., Castronovo V., Ménard S., Giavazzi R., Marzola M., Belotti D., Taraboletti G. Expression of the 67 kD laminin receptor in human ovarian carcinomas as defined by a monoclonal antibody, MLuC5. *Eur. J. Cancer, 1996, vol. 32, no. 9, pp. 1598–1602. doi: 10.1016/0959-8049(96)00119-0*
55. Wang K.S., Kuhn R.J., Strauss E.G., Ou S., Strauss J.H. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J. Virol., 1992, vol. 66, pp. 4992–5001. doi: 10.1128/JVI.66.8.4992-5001.1992*
56. Wen J.-S., Zhao W.-Z., Liu J.-W., Zhou H., Tao J.-P., Yan H.-J., Liang Y., Zhou J.-J., Jiang L.-F. Genomic analysis of a Chinese isolate of Getah-like virus and its phylogenetic relationship with other *Alphaviruses. Virus Genes, 2007, vol. 35, pp. 597–603. doi: 10.1007/s11262-007-0110-3*
57. Wollmann G., Tattersall P., van den Pol A.N. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J. Virol., 2005, vol. 79, pp. 6005–6022. doi: 10.1128/JVI.79.10.6005-6022.2005*
58. Yu M., Scherwitzl I., Opp S., Tsirigos A., Meruelo D. Molecular and metabolic pathways mediating curative treatment of a non-Hodgkin B cell lymphoma by Sindbis viral vectors and anti-4-1BB monoclonal antibody. *J. Immunother. Cancer, 2019, vol. 7, no. 1: 185. doi: 10.1186/s40425-019-0664-3*
59. Zhang H., Lin Y., Li K., Liang J., Xiao X., Cai J., Tan Y., Xing F., Mai J., Li Y., Chen W., Sheng L., Gu J., Zhu W., Yin W., Qiu P., Su X., Lu B., Tian X., Liu J., Lu W., Dou Y., Huang Y., Hu B., Kang Z., Gao G., Mao Z., Cheng S.-Y., Lu L., Bai X.-T., Gong S., Yan G., Hu J. Naturally existing oncolytic virus M1 is nonpathogenic for the nonhuman primates after multiple rounds of repeated intravenous injections. *Human Gene Ther., 2016, vol. 27, no. 9, pp. 700–711. doi: 10.1089/hum.2016.038*
60. Zhang J., Liu Y., Tan J., Zhang Y., Wong C.-W., Lin Z., Liu X., Sander M., Yang X., Liang L., Song D., Dan J., Zhou Y., Cai J., Lin Y., Liang J., Hu J., Yan G., Zhu W. Necroptotic virotherapy of oncolytic Alphavirus M1 cooperated with Doxorubicin displays promising therapeutic efficacy in TNBC. *Oncogene, 2021, vol. 40, no. 29, pp. 4783–4795. doi: 10.1038/s41388-021-01869-4*
61. Zhang S., Rabkin S.D. The discovery and development of oncolytic viruses: are they the future of cancer immunotherapy? *Expert Opin. Drug Discov., 2021, vol. 16, no. 4, pp. 391–410. doi: 10.1080/17460441.2021.1850689*
62. Zhang Y.-Q., Tsai Y.-C., Monie A., Wu T.-C., Hung C.-F. Enhancing the therapeutic effect against ovarian cancer through a combination of viral oncolysis and antigen-specific immunotherapy. *Mol. Ther., 2010, vol. 18, pp. 692–699. doi: 10.1038/mt.2009.318*
63. Zhao H., Garoff H. Role of cell surface spikes in Alphavirus budding. *J. Virol., 1992, vol. 66, pp. 7089–7095. doi: 10.1128/JVI.66.12.7089-7095.1992*
64. Zimmerman O., Holmes A.C., Kafai N.M., Adams L.J., Diamond M.S. Entry receptors — the gateway to Alphavirus infection. *J. Clin. Invest., 2023, vol. 133, no. 2: e165307. doi: 10.1172/JCI165307*

**Авторы:**
**Назаренко А.С.**, научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;
**Бирюкова Ю.К.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;
**Колясникова Н.М.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;
**Ворович М.Ф.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия; доцент кафедры организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия;
**Пестов Н.Б.**, к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;
**Ишмухаметов А.А.**, академик РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия; руководитель кафедры организации и технологии иммунобиологических препаратов ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия.

**Authors:**
**Nazarenko A.S.**, Researcher, Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;
**Biryukova Yu.K.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;
**Kolyasnikovaa N.M.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Head of Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;
**Vorovitch M.F.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Organization and Research of Immunobiological Technologies, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
**Pestov N.B.**, PhD (Chemistry), Leading Researcher, Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;
**Ishmukhametov A.A.**, RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, General Director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Organization and Research of Immunobiological Technologies, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.05.2023
Принята к печати 28.08.2023

Received 26.05.2023
Accepted 28.08.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 642–652

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 642–652

# ОПТИМИЗАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ РЕАКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ЧЕЛОВЕКА К АНТИГЕНАМ ВИРУСА SARS-CoV-2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

**О.М. Стрижакова, А.С. Першин, А.А. Казаров, И.В. Лягоскин, Я.А. Бахарева, А.П. Васильев, Ю.А. Никонова, И.Ю. Егорова, Р.Р. Шукуров, Р.А. Хамитов**

*АО «ГЕНЕРИУМ», пгт. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, Россия*

**Резюме.** Адекватный и репрезентативный мониторинг популяционного иммунитета к вирусу COVID-19, включая долгосрочное влияние на переболевших и вакцинированных людей, должен включать не только исследование гуморального, но также и Т-клеточного иммунного ответа. При этом важную информацию может дать не только способность клеток активироваться в ответ на специфический антиген, но и определение фенотипа реактивных клеток. Для этого нами разработан метод проточной цитометрии для оценки содержания антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих внутриклеточный IFNγ под воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека антигенов вируса SARS-CoV-2, и проведена его валидация. Валидационные испытания методики проводили по следующим характеристикам: чувствительность, специфичность, прецизионность и робастность. Валидационные испытания методики по характеристикам «чувствительность» и «специфичность» проводили, исследуя положительные образцы доноров, переболевших COVID-19, с диагнозом, верифицированным лабораторными методами, и отрицательные образцы, отобранные от доноров с отрицательным анамнезом, не контактировавших с больными COVID-19, с отсутствием антител к антигенам SARS-CoV-2. Из крови доноров выделяли мононуклеарные клетки периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла и стимулировали специфические Т-клетки пептидами, соответствующими основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2 — пептиды S-белка и пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a. Учитывали данные на проточном цитометре, выделяя Т-клетки, продуцирующие IFNγ, и проводили статистический анализ полученных результатов. Значения площади, ограниченной ROC-кривой и осью ложноположительных классификаций (AUC) для популяций CD4 и CD8, составило от 0,97 до 1,00. Методика показала приемлемую сходимость и внутрилабораторную прецизионность, поскольку коэффициенты вариации для всех образцов МКПК не превышали 20%. Была подтверждена робастность при использовании МКПК в свежеприготовленном виде и после цикла заморозки/разморозки. По итогам валидации установлены границы определения позитивного и негативного отклика: для CD4-позитивных Т-клеток — 0,029%, для CD8-позитивных Т-клеток — 0,064–0,068%, а также критерии приемлемости для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных антигенов. Таким образом подтверждена пригодность методики «Оценка антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих вну-

**Адрес для переписки:**
Першин Андрей Сергеевич
601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, ул. Владимирская, 14, АО «ГЕНЕРИУМ».
Тел.: 8 (495) 988-47-94. E-mail: aspershin@generium.ru

**Contacts:**
Andrei S. Pershin
601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Vladimirskaya str., 14, JSC "GENERIUM".
Phone: +7 (495) 988-47-94. E-mail: aspershin@generium.ru

**Для цитирования:**
Стрижакова О.М., Першин А.С., Казаров А.А., Лягоскин И.В., Бахарева Я.А., Васильев А.П., Никонова Ю.А., Егорова И.Ю., Шукуров Р.Р., Хамитов Р.А. Оптимизация и валидация количественного метода оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 642–652. doi: 10.15789/2220-7619-OAV-2084

**Citation:**
Strizhakova O.M., Pershin A.S., Kazarov A.A., Lyagoskin I.V., Bahareva Ya.A., Vasil'ev A.P., Nikonova Yu.A., Egorova I.Yu., Shukurov R.R., Khamitov R.A. Optimization and validation of flow cytometry method for quantification of SARS-CoV-2 antigen-reactive human memory T cells // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 642–652. doi: 10.15789/2220-7619-OAV-2084



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-OAV-2084

триклеточный IFNγ под воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови человека антигенов вируса SARS-CoV-2, методом проточной цитометрии» для получения достоверных результатов при определении содержания внутриклеточного IFNγ в МКПК. Методику использовали при характеризации стандартных контрольных образцов для внутреннего контроля качества наборов ТиграТест® SARS-CoV-2.

***Ключевые слова:*** *SARS-CoV-2, Т-клеточный иммунитет, пептиды коронавируса, цитометрия, метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), валидация.*

## OPTIMIZATION AND VALIDATION OF FLOW CYTOMETRY METHOD FOR QUANTIFICATION OF SARS-CoV-2 ANTIGEN-REACTIVE HUMAN MEMORY T CELLS

**Strizhakova O.M., Pershin A.S., Kazarov A.A., Lyagoskin I.V., Bahareva Ya.A., Vasil'ev A.P., Nikonova Yu.A., Egorova I.Yu., Shukurov R.R., Khamitov R.A.**

*JSC "GENERIUM", Volginsky, Petushinsky District, Vladimir Region, Russian Federation*

**Abstract.** A proper and representative monitoring of SARS-CoV-2 herd immunity including a long-term health impact on recovered patients and vaccinated individuals is of great importance. For this, a monitoring campaign should assesses both humoral and T-cell immune arms. Upon that, analyzing antigen specific-cell activation and cellular phenotype are informative. We developed a flow cytometry method for detection of intracellular IFNγ-producing antigen-reactive T cells after exposure of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to SARS-CoV-2 virus antigens. The method was validated according to the following characteristics: sensitivity, specificity, precision, and robustness. We used positive samples from donors recovered from COVID-19 and negative samples from donors who had no contact with COVID-19 patients and lacking antibodies to SARS-CoV-2. All samples were tested by laboratory methods. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from donor blood by centrifugation in a Ficoll density gradient. Specific T cells were stimulated with S-protein as well as N, M, ORF3a, and ORF7a protein peptides to count IFNγ-producing T cells by flow cytometer. The data were statistically analyzed. The area limited by ROC-curve and false positive rate (AUC) for CD4 and CD8 cells was from 0.97 to 1.00. Precision was considered acceptable because the coefficient of variation for all PBCM did not exceed 20%. Robustness was confirmed for frozen and freshly prepared PBMC samples. The thresholds levels to recognize immune and non-immune samples were defined for CD4-positive T-cells (0.029%) and CD8-positive T-cells (0.064–0.068%). Also, acceptance criteria for positive and negative controls were defined. Based on the validation, the suitability of the method "Evaluation of antigen-reactive T cells that produce intracellular IFN in response to SARS-CoV-2 virus antigens by flow cytometry" was confirmed. The method allows for reliable data that was used to characterize standard control samples for internal quality control of TigraTest® SARS-CoV-2 kits.

***Key words:*** *SARS-CoV-2, T-cells immunity, COVID-19, coronavirus peptides, flow cytometry, intracellular cytokine staining, validation.*

## Введение

В начале 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) классифицировала вспышку нового типа коронавируса COVID-19 как пандемию. С тех пор целью многих эпидемиологических и экспериментальных работ было исследование иммунологических аспектов коронавирусной инфекции, что, в свою очередь, способствовало поиску методов ее лечения и профилактики.

Клинические проявления SARS-CoV-2 варьируют от бессимптомной инфекции до тяжелой дыхательной недостаточности. Механизмы, которые определяют особенности течения болезни, остаются до конца невыясненными. Есть основания полагать, что наличие иммунного ответа, в котором задействованы Т-клетки памяти, является ключевым звеном в формировании устойчивого защитного иммунитета в отношении SARS-CoV-2 [2, 5, 7, 9, 17]. Кроме того, специфичный к SARS-CoV-2 Т-клеточный иммунный ответ сохраняется после элиминации нейтрализующих антител в течение по крайней мере 12 месяцев [8, 12]. В связи с этим проведение мониторинга не только гуморального, но и Т-клеточного популяционного иммунитета к вирусу COVID-19 следует считать необходимым элементом эпидемиологического надзора в условиях пандемии.

Существует ряд методов, которые позволяют измерять иммунологические биомаркеры в материале, полученном из венозной крови — ткани, наиболее доступной для иммунологического исследования в клинических испытаниях [7, 16]. Для выявления иммунологических биомаркеров в форме экспрессированных цитокинов хорошо зарекомендовал себя метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), применяемый к стимулированным мононуклеарным клеткам периферической крови (МКПК) с последующим проточным цитометрическим анализом. Внутриклеточное окрашивание цитокинов, в отличие от альтернативных подходов (ELISpot или ELISA), позволяет обнаруживать специфическое подмножество клеток-респондеров (например, CD4- или CD8-положительные Т-клетки), выявлять ассоциированные маркеры дифференцировки (например, маркеры фенотипа памяти или состояния

активации), проводить функциональные тесты (например, регистрировать продукцию цитокинов, маркеров цитотоксичности и т. д.), детектируя одновременно экспрессию нескольких цитокинов/хемокинов и маркеров пролиферации. Современные многопараметрические инструменты позволяют одновременно измерять экспрессию многих маркеров [5, 9].

Цель нашей работы — разработать и валидировать метод проточной цитометрии для оценки содержания антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих внутриклеточный IFNγ под воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови человека антигенов вируса SARS-CoV-2.

## Материалы и методы

*Добровольцы, участвующие в исследовании. Образцы крови.* Все добровольцы, участвующие в исследовании, заполняли опросный лист с указанием основных характеристик, симптомов заболевания, наличия инфекции SARS-CoV-2, подтвержденной лабораторными тестами, наличия пневмонии, подтвержденной компьютерной томографией, дату иммунизации (если была) и использованный вакцинный препарат. Условно здоровые доноры также отмечали отсутствие продолжительных контактов с больными COVID-19.

Взятие обазцов крови осуществлялось венепункцией в условиях процедурного кабинета АО «ГЕНЕРИУМ» в период с апреля по июль 2021 г. в пгт. Вольгинский Владимирской области (Россия). От каждого донора было получено добровольное информированное согласие на взятие образцов крови и включение результатов их анализа в данное исследование. Проведение исследования было одобрено локальным независимым этическим комитетом при АО «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 01 от 11.11.2020). У переболевших COVID-19 кровь отбирали в интервале от 1 до 10 мес. после исчезновения симптомов заболевания или наличия отрицательного теста ПЦР.

*Выделение мононуклеарных клеток периферической крови и приготовление рабочих суспензий.* Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($\rho$ = 1,077 г/см$^3$) (НПП «ПанЭко», Россия) не позднее чем через 1 ч после забора крови. Подсчет клеток проводили с использованием счетчика клеток — NucleoCounter® NC-100. Готовили рабочую суспензию клеток МКПК с концентрацией $5{,}0 \times 10^6$ кл/мл и вносили в каждую лунку планшета по $5{,}0 \times 10^5$ МКПК (оптимальное количество) в среде ADCF-Mab® (HyClone, США) в объеме 100 мкл либо замораживали.

*Криоконсервация.* Клетки осаждали центрифугированием при 400g. Осадок клеток ресуспендировали в среде для криоконсервации клеток (эмбриональная телячья сыворотка (FBS, Capricorn Scientific, Германия) с добавлением 10% диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США)), доводя содержание до $5{,}0 \times 10^6$ кл/мл. Суспензию вносили по 1,0 мл в промаркированные криопробирки, которые помещали в коробку из пенопласта с крышкой и охлаждали в морозильной камере при температуре не выше минус 70°C. Через 24–72 ч пробирки переносили в криохранилище с жидким азотом и хранили до использования.

*Размораживание МКПК.* Криопробирку с клетками размораживали на водяной бане при температуре (37±1)°C. Содержимое криоампул переносили в пробирку, содержащую 5,0 мл среды для постановки теста. Центрифугировали 1 мин при 400g и температуре (20±5)°C. Осадок клеток ресуспендировали в 1,0 мл среды для постановки теста и определяли их количество и жизнеспособность с помощью счетчика клеток. Готовили рабочую суспензию МКПК для проведения анализа по живым клеткам.

*Антигены и контроли.* В качестве антигенов для стимуляции специфических Т-клеток использовали пептиды, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2: панель антигенов № 1 (АГ1, пептиды S-белка) и антигенов № 2 (АГ2, пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a). Пептиды, соответствующие основным белковым антигенам коронавируса SARS-CoV-2 для стимуляции специфических Т-клеток, были выбраны на основе публикаций, идентифицировавших репертуар и встречаемость различных эпитопов для TCR у пациентов и конвалесцентов COVID-19. С помощью биоинформатического анализа в основном были исключены эпитопы, способные давать значительную кросс-реактивность с Т-клеточными эпитопами так называемых «простудных» коронавирусов штаммов OC43, NL63, 229E, HKU1. Для выбора оптимального набора пептидов, учитывая распространенность TCR эпитопов и их соответствие генотипам HLA в человеческой популяции, использовали следующие работы и базы данных [14, 17, 21, 24, 25, 26].

Для каждого образца МКПК использовали 8 лунок. Отрицательный и положительный контроль применяли для каждого образца индивидуально. В качестве отрицательного контроля использовали среду ADCF-Mab® (HyClone, США), в качестве положительного контроля — раствор фитогемагглютинина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) с конечной концентрацией в лунке 7 мкг/мл.

*Процедура анализа.* Планшеты инкубировали при температуре (37±1)°C, содержании $CO_2$ (5,0±0,5)% и влажности 95% в течение 16–24 ч. По окончании инкубации в каждую из лунок вносили по 10 мкл рабочего раствора ингибитора транспорта белков в среде ADCF-Mab® (HyClone, США) из расчета 1 мкл ингибитора на $1 \times 10^6$ клеток. Инкубировали 4 ч при температуре (37±1)°C в атмосфере (5,0±0,5)% $CO_2$ при влажности 95%.

По окончании инкубации МКПК два раза отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая центрифугированием в течение 5 мин при 500g и температуре (20±5)°C. Вносили раствор реагента Fixable Viability Stain 510 (BD Biosceinces, США) в PBS (1 мкл реагента на $1 \times 10^6$ клеток). Инкубировали в течение (9±2) мин при температуре (37±1)°C. Клетки отмывали два раза фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая центрифугированием при 500g и температуре (20±5)°C.

В лунки с МКПК вносили реагенты для иммунофенотипирования — мышиные антитела против человеческого CD3, меченые PerCP-Cy™ 5.5 (клон UCHT1); мышиные антитела против человеческого CD4, меченые PE (клон RPA-T4); мышиные антитела против человеческого CD8, меченые BB515 (клон RPA-T8) до финального разведения 1:150 в FACS-буфере с добавлением раствора для блокирования неспецифического связывания с Fc-рецепторами клеток (Fc Blook, BD Biosceinces, США) в соотношении 1:100. Инкубировали планшет в течение (30±5) мин при температуре (5±2)°C. По окончании инкубации клетки трижды отмывали FACS буфером, осаждая клетки центрифугированием при 500g и температуре (5±3)°C.

Осадок МКПК ресуспендировали в 100 мкл/лунка раствора для фиксации (Fixation Buffer, BD Biosceinces, США) и инкубировали в течение (20±2) мин при температуре (5±2)°C. После инкубации дважды отмывали клетки охлажденным FACS-буфером.

Клетки МКПК однократно отмывали рабочим раствором для пермеабилизации и отмывки (Perm/Wash, BD Biosceinces, США) и ресуспендировали в растворе Perm/Wash. Инкубировали в течение (20±2) мин при температуре (5±2)°C. После инкубации клетки осаждали и вносили (кроме неокрашенной пробы и FMO-контроля по IFNγ) реагент для определения IFNγ (мышиные антитела, специфичные к человеческому IFNγ меченые BV421, клон B27) до финального разведения 1:100. Инкубировали в течение (30±5) мин при температуре (5±2)°C. После инкубации дважды отмывали клетки раствором для пермеабилизации, осаждая центрифугированием при 500g и температуре (5±2)°C. Осадок ресуспендировали в растворе Perm/Wash.

*Обработка результатов анализа.* Все результаты были получены на проточном цитометре BD FACSCanto II с использованием шаблонов, созданных с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, версия 6.1.3).

Оптимальные значения интенсивности флуоресценции (MFI) (для каждого из флуорохромов в панели PerCP-Cy™5.5; PE; BB515 BV421) были получены методом титрования напряжений с измерением индекса окрашивания (Stain Index) до достижения максимального разделения позитивной и негативной популяций. Целевой диапазон MFI для каждого флуоресцентного канала был установлен с использованием среднего значения MFI±два стандартных отклонения.

Для ежедневной настройки прибора перед сбором обработанных образцов был проведен ряд шагов по стандартизации. Сначала были запущены Cytometer Setup и Tracking beads (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), и полученные настройки были использованы в эксперименте. Затем напряжения на фотоэлектронном умножителе были отрегулированы так, чтобы они попадали в заданный целевой диапазон MFI.

Для установки компенсации для учета спектрального перекрытия между флуоресцентными каналами использовали набор для оптимизации настроек компенсации флуоресценции для многоцветных проточных цитометрических анализов BD CompBeads Anti-Mouse Ig k/Negative Control Compensation Particles Set (BD Biosciences).

При выполнении цитометрического анализа использовали следующий порядок гейтирования: из целевой популяции клеток выделяли живые клетки, затем выделяли CD3-положительную популяцию, затем — CD4- и CD8-позитивные клетки, среди которых выделяли Т-клетки, позитивные по маркерам IFNγ (рис. 1, II обложка). Для достоверности получаемых данных в живых клетках регистрировали не менее 20 000 событий.

## Результаты

Нами была проведена серия предварительных экспериментов для определения оптимальных реагентов, объемов, времени и других процедурных деталей проточного цитометрического анализа. Затем, используя оптимизированный метод, определяли чувствительность, специфичность, прецизионность и робастность.

Валидационные испытания методики по характеристикам «чувствительность» и «специфичность» проводили, исследуя образцы:

– положительные — МКПК от 18 доноров, переболевших COVID-19, с диагнозом, верифицированным лабораторными методами

(ПЦР, ИФА), и 1 донора, привитого вакциной «Спутник V» (АО «ГЕНЕРИУМ»);

– отрицательные — мононуклеарные клетки периферической крови, отобранные от 9 доноров с отрицательным анамнезом, не контактировавших с больными COVID-19, с отсутствием антител к антигенам SARS-CoV-2 (по результатам ИФА).

При исследовании материала от интактных и переболевших доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2 определяли процентное содержание продуцентов IFNγ среди CD4- и CD8-позитивных Т-клеток. Далее применяли ROC-анализ [1, 29] и определяли для каждой из двух популяций значения AUC (площади, ограниченной ROC-кривой и осью ложноположительных классификаций). Информативность метода считалась приемлемой при условии, что AUC составляла не менее 0,7.

Результаты оценки приведены в табл. 1–2 и на рис. 2–3.

Для исследования прецизионности методики использовали образцы МКПК от трех доноров — двух переболевших и одного вакцинированного. Прецизионность оценивали на двух уровнях — сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Оценку сходимости выполняли 2 оператора, каждый из которых выполнил по 3 независимых измерения для 3 образцов МКПК от разных доноров, в 2 аналитических циклах (АЦ), с использованием обеих панелей антигенов вируса SARS-CoV-2 (всего 4 АЦ).

Для оценки сходимости отдельно в каждом АЦ вычисляли дисперсию значений процентного содержания продуцентов IFNγ, полученных при повторных измерениях каждого образца МКПК. Значения дисперсии усредняли между АЦ и опе-

**Таблица 1. Сводные результаты определения процентного содержания продуцентов IFNγ среди CD4- и CD8-позитивных Т-клеток при исследовании образцов МКПК от иммунных и неиммунных доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2**

Table 1. The percentage of IFNγ producing CD4 and CD8 T cells among immune and non-immune donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2)

| **Популяция Т-клеток** T-cell population | **CD4⁺** | | **CD8⁺** | |
|---|---|---|---|---|
| **Панель антигенов** Antigen panel | **АГ1** Ag1 | **АГ2** Ag2 | **АГ1** Ag1 | **АГ2** Ag2 |
| **Иммунные доноры** Immune donors | | | | |
| **Интервал значений** Range % (IFNγ+) | 0,022–0,108 | 0,021–0,138 | 0,072–0,213 | 0,046–0,374 |
| **Среднее значение** Average value % (IFNγ+) | 0,060 | 0,061 | 0,138 | 0,183 |
| **%CV** | 41,9 | 50,2 | 29,3 | 48,1 |
| **Неиммунные доноры** Non-immune donors | | | | |
| **Интервал значений** Range of % (IFNγ+) | 0,011–0,031 | 0,009–0,028 | 0,010–0,057 | 0,017–0,051 |
| **Среднее значение** Average value % (IFNγ+) | 0,019 | 0,020 | 0,035 | 0,030 |
| **%CV** | 35,9 | 31,0 | 45,9 | 35,5 |

**Таблица 2. Результаты ROC-анализа (оценка информативности метода, подбор порогового значения для оптимизации чувствительности и специфичности)**

Table 2. ROC analysis (i.e., evaluation of assay's threshold to optimize both sensitivity and specificity)

| **Т-клетки** T-cells type | **Панель антигенов** Antigens panel | **AUC (95% ДИ)** AUC (95% CI) | **Пороговое значение** Threshold | **Чувствительность** % Sensitivity | **Специфичность** % Specificity |
|---|---|---|---|---|---|
| **CD4⁺** | **АГ1** Ag1 | 0,97 (0,91–1,00) | 0,029 | 88,9 | 88,9 |
| | **АГ2** Ag2 | 0,97 (0,91–1,00) | 0,029 | 94,4 | 100,0 |
| **CD8⁺** | **АГ1** Ag1 | 1,00 (1,00–1,00) | 0,064 | 100,0 | 100,0 |
| | **АГ2** Ag2 | 0,99 (0,97–1,00) | 0,068 | 94,4 | 100,0 |

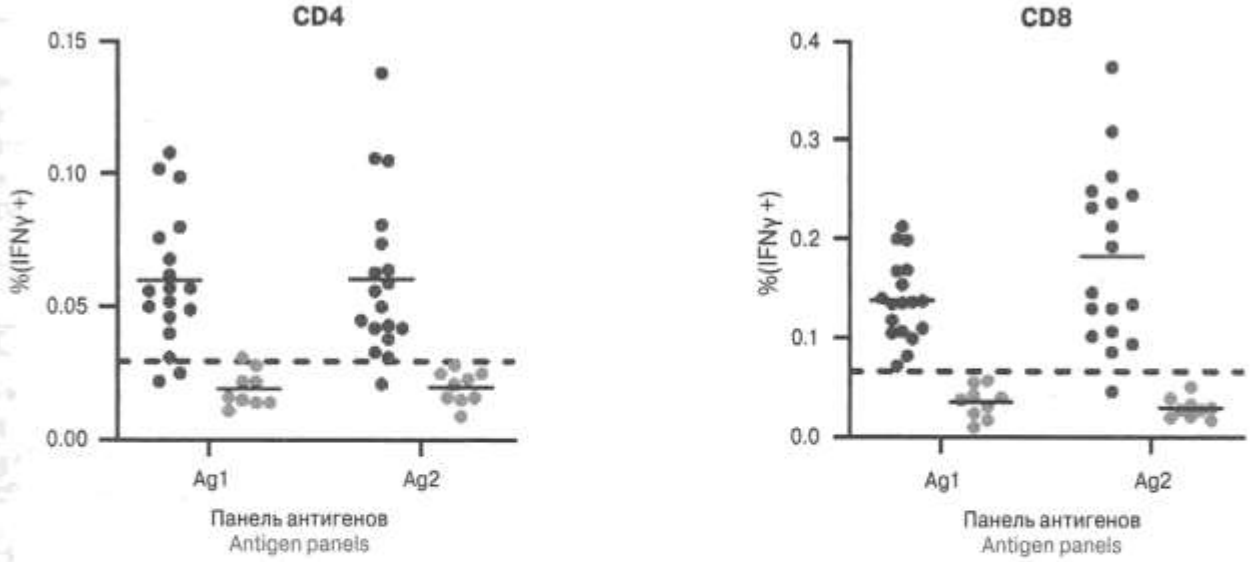


**Рисунок 2. Результаты определения процентного содержания продуцентов IFNγ среди CD4-позитивных (слева) и CD8-позитивных (справа) Т-клеток при исследовании образцов МКПК от иммунных (темные маркеры) и неиммунных (светлые маркеры) доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2**

Figure 2. The percentage of IFNγ producing CD4 (left) and CD8 (right) T-cells among immune (dark dots) and non-immune (light dots) donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2)

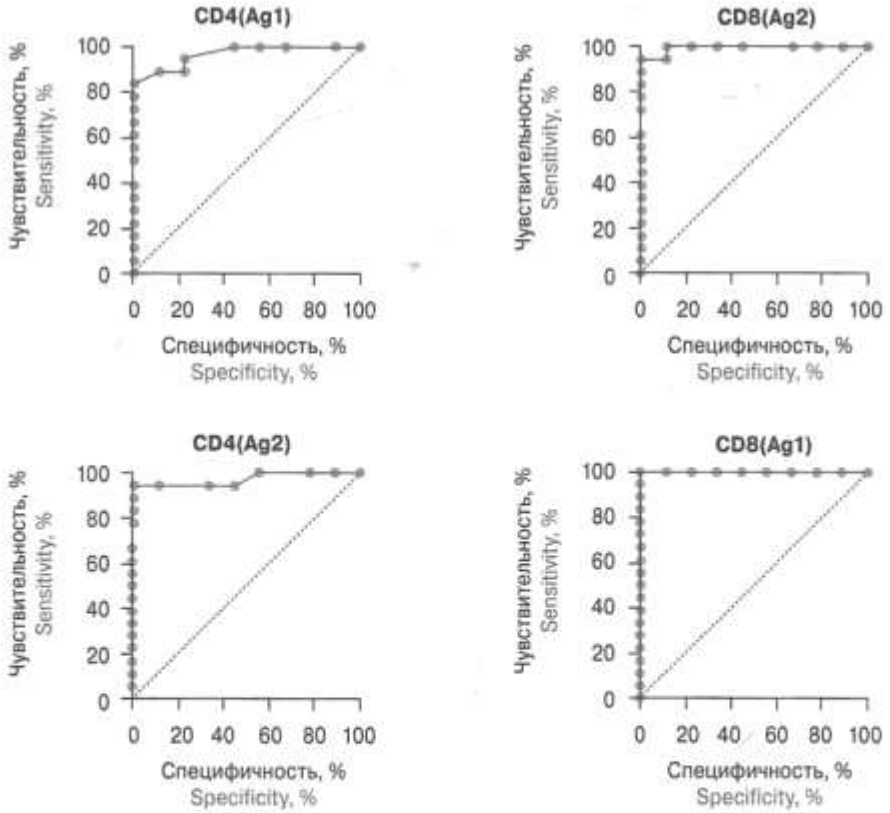


**Рисунок 3. ROC-кривые, полученные при исследовании процентного содержание продуцентов IFNγ среди CD4- и CD8-позитивных Т-клеток у иммунных и неиммунных доноров с использованием панелей АГ1 и АГ2 антигенов вируса SARS-CoV-2**

Figure 3. ROC analysis for percentage of IFNγ-producing CD4 and CD8 T-cells among immune and non-immune donor-derived PBMC samples incubated with SARS-CoV-2 antigen panels (Ag1 and Ag2)

**Таблица 3. Результаты оценки сходимости и внутрилабораторной прецизионности**
Table 3. Repeatability and intermediate precision assessment

| **Популяция Т-клеток** T-cell population | **CD4⁺** | | **CD8⁺** | |
|---|---|---|---|---|
| **Панель антигенов** Antigen panel | **АГ1** Ag1 | **АГ2** Ag2 | **АГ1** Ag1 | **АГ2** Ag2 |
| **CV сходимости** %CV of repeatability | 16,5–18,8 | 11,7–17,5 | 3,8–6,9 | 4,7–13,8 |
| **CV внутрилабораторной прецизионности** %CV of intermediate precision | 14,2–19,3 | 11,4–19,0 | 6,5–15,3 | 8,9–13,3 |

раторами (полученное значение далее в тексте обозначается как Vсх) и вычисляли коэффициент вариации сходимости (%CVсх) как отношение квадратного корня усредненной дисперсии к среднему значению процентного содержания продуцентов IFNγ для каждого образца МКПК (далее в тексте обозначается как М).

**Таблица 4. Результаты оценки криостабильности МКПК как показателя робастности методики**
Table 4. Comparison of frozen and freshly prepared PBMCs samples

| **Донор МКПК** PBMCs donor | **Статус образца МКПК** PBMCs sample | **Результат** Result | **Превышение порогового значения (0,064%)** Threshold exceeded (0,064%) |
|---|---|---|---|
| 1 | **Свежеприготовленный** Freshly prepared | 0,200 | **Да** Yes |
| | **Замороженный** Frozen | 0,233 | **Да** Yes |
| 2 | **Свежеприготовленный** Freshly prepared | 0,168 | **Да** Yes |
| | **Замороженный** Frozen | 0,173 | **Да** Yes |
| 3 | **Свежеприготовленный** Freshly prepared | 0,199 | **Да** Yes |
| | **Замороженный** Frozen | 0,147 | **Да** Yes |

Для оценки внутрилабораторной прецизионности в каждом АЦ вычисляли значения процентного содержания продуцентов IFNγ, усредненные по повторным измерениям каждого образца МКПК. Далее вычисляли стандартное отклонение между усредненными результатами каждого АЦ (далее в тексте обозначается как Vмц). Коэффициент вариации внутрилабораторной прецизионности (CVвв) вычисляли по формуле [3]:

$$\%CV\text{вв} = \frac{\sqrt{V\text{мц} + \left(1 - \frac{1}{N}\right) V\text{сх}}}{M},$$

где N — количество измерений образца в пределах АЦ, остальные условные обозначения см. в тексте.

Полученные значения приведены в табл. 3.

Для оценки криостабильности образцы МКПК от 3 доноров анализировали в свежеприготовленном виде и после однократного цикла заморозки/разморозки. Анализ проводили только в формате CD8/АГ1. Полученные результаты приведены в табл. 4.

В качестве дополнения был выполнен расчет критериев приемлемости для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных антигенов, используемых в анализе (см. табл. 5). Для этого значения отклика, полученные в опытах по оценке чувствительности и специфичности (см. выше), были

**Таблица 5. Расчет критериев приемлемости для показателей отклика положительного и отрицательного контрольных антигенов**
Table 5. Evaluation of acceptance criteria for positive and negative controls' response

| | **Отрицательный контроль** Negative control | **Положительный контроль** Positive control |
|---|---|---|
| **Размах отклика** Response range | 0,010–0,065 | 0,759–6,02 |
| **То же после логарифмирования** Log-response range | от –2,000 до –1,367 | от –0,120 до 0,780 |
| **Усредненный логарифмированный отклик** Averaged log-response | –1,659 | 0,351 |
| **Стандартное отклонение** Standart deviation | 0,216 | 0,246 |
| **Вычисленное значение критерия приемлемости** Acceptance criterion | ≤ 0,059 | ≥ 0,725 |

логарифмированы по основанию 10. Для них были вычислены среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD). Значения критериев приемлемости как предельные значения отклика (L), обеспечивающие ожидаемую частоту сбоев не выше 5%, были вычислены по формулам:

– для отрицательного контроля: $L(-) \leq 10^{M+2SD}$;
– для положительного контроля: $L(+) \geq 10^{M-2SD}$.

## Обсуждение

Сбалансированный иммунный ответ связан с более легким течением заболевания, при этом важную в иммунитете COVID-19 роль играют $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки. У лиц с нарушенной регуляцией антиген-специфического ответа, например, в возрасте более 65 лет, имеющих связанный со старением дефицит наивных Т-клеток, чаще наблюдается плохой исход [18]. При анализе Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 необходимо дифференцировать ответ перекрестно-реактивых к эндемичным коронавирусам человека (HCoV) Т-клеток. Активация Т-клеток антигенами SARS-CoV-2, в зависимости от исследования, наблюдалась у 35–90% здоровых людей, чья иммунная система не встречалась с данным патогеном [7, 14, 19, 20, 25, 29]. При этом находящиеся в дыхательных путях перекрестно-реактивные Т-клетки важны для защиты от аэрозольной трансмиссии SARS-CoV-2 [11]. Кроме того, количество перекрестно-реактивных Т-клеток коррелирует с исходом инфекции после воздействия SARS-CoV-2 [13]. Т-клетки, отвечающие на SARS-CoV-2 у наивных пациентов, можно отличить от клеток после инфекции COVID-19 по профилю секреции цитокинов после стимуляции пулом пептидов SARS-CoV-2 [27]. Цитометрические анализы экспрессии цитокинов, маркеров активации или пролиферации, демонстрируют высокую чувствительность, позволяя определять истинный статус образцов [22].

Проточная цитометрия еще не достигла такой же степени стандартизации, как другие лабораторные методы. В условиях поисковых исследований не всегда проводится строгая проверка эффективности анализа. Это создает проблему при определении уровня детализации, точки отсечения, приемлемой точности и других критериев достоверности метода. В нашей работе мы описываем общий подход для оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии.

В рамках выполненной работы нами проведено экспериментальное подтверждение пригодности метода для получения достоверных результатов. В ходе валидационных испытаний методики по характеристикам «чувствительность» и «специфичность», для CD4 и CD8 популяций Т-клеток и обеих панелей антигенов получены значения AUC выше 0,95, что подтверждает высокую информативность метода. Пороговые значения сигнала (процентного содержания продуцентов IFNγ), обеспечивающие оптимальную чувствительность и специфичность (около 90% и выше), составили для CD4-позитивных Т-клеток 0,029%, для CD8-позитивных Т-клеток 0,064–0,068%.

Критерии приемлемости при оценке внутрилабораторной прецизионности и сходимости были нами установлены на основе перечня основополагающих специализированных работ [4, 10, 23, 28]. Сходимость и внутрилабораторная прецизионность считались приемлемыми, если %CVсх и %CVвв по всем образцам МКПК не превышали 20%. Оптимальную сходимость и внутрилабораторную прецизионность показал формат метода CD8/АГ1 и CD8/АГ2, предполагающий определение процентного содержания продуцентов IFNγ среди CD8-позитивных Т-клеток с использованием панели антигенов АГ1 и АГ2. Этот формат решено использовать в дальнейшем как основной при проведении рутинных анализов.

В качестве показателя робастности методики нами была выбрана стадия заморозки/разморозки образца МКПК, которая может влиять на состояние клеток и их способность продуцировать IFNγ в присутствии антигена. В ходе экспериментов робастность подтвердили, установив, что для всех образцов МКПК в свежеприготовленном виде и после цикла заморозки/разморозки результат определения значений процентного содержания CD8-позитивных Т-клеток по маркерам IFNγ был выше порогового значения, определенного при оценке чувствительности и специфичности (0,064%). Таким образом, в ходе исследований была доказана возможность использования в данном методе как свежевыделенных, так и замороженных МКПК.

Спонтанное высвобождение IFNγ в анализах было описано в литературе и было связано с образцами PBMC от доноров с повышенными уровнями предшествующей иммунной активации как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клеток [15]. Чтобы отличить пептид-специфические ответы в образцах PBMC от высокого неспецифического фона, мы установили подтверждающую точку отсечения для отрицательного контроля. Эта точка отсечения будет использоваться для определения специфичности пептидного ответа (если и пептидная стимуляция и отсутствие пептидной стимуляции привели к ответам). У лиц с нарушенной регуляцией антиген-

специфического ответа, например, имеющих связанный со старением дефицит наивных Т-клеток [14], возможна низкая степень активации иммунокомпетентных клеток в ответ на патоген. Чтобы подтвердить отсутствие нарушений регуляции антиген-специфического ответа мы установили подтверждающую точку отсечения для положительного контроля (не менее 0,725).

На основании описанных результатов валидации метод был признан пригодным для оценки реактивности Т-клеток памяти человека к антигенам вируса SARS-CoV-2 с использованием проточной цитометрии.

## Выводы

По итогам валидации, подтверждена пригодность методики «Оценка антиген-реактивных Т-клеток, продуцирующих внутриклеточный IFNγ при воздействием на мононуклеарные клетки периферической крови человека антигенов вируса SARS-CoV-2, методом проточной цитометрии» для получения достоверных результатов при определении содержания внутриклеточного IFNγ в МКПК. Методику использовали при характеризации стандартных контрольных образцов для внутреннего контроля качества наборов ТиграТест® SARS-CoV-2.

## Список литературы/References


1. ГОСТ Р 5302.3-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. [State Standard P 5302.3-2008. Clinical laboratory technologies. Requirements for quality of clinical laboratory tests. Part 3. Assessment of laboratory tests clinical significance *(In Russ.)*]
2. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатьева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2 // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021. Т. 21, № 3. С. 178–192. [Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatyeva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. BIOpreparaty. *Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment, 2021, vol. 21, no. 3, pp. 178–192. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192*
3. РМГ 61-2010. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. Москва, 2013. [State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. *Moscow, 2013. (In Russ.)*]
4. Barnett D., Louzao R., Gambell P., De J., Oldaker T., Hanson C.A., ICSH/ICCS Working Group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS — part IV — postanalytic considerations. *Cytometry B Clin. Cytom., 2013, vol. 84, pp. 309–314. doi: 10.1002/cyto.b.21107*
5. Bert N.L., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I.-C., Wang L.-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G.-H., Tan Y.-J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature, 2020, vol. 584, pp. 457–462. doi: 10.1038/s41586-020-2550-z*
6. Beveridge N.E.R., Price D.A., Casazza J.P., Pathan A.A., Sander C.R., Asher T.E., Ambrozak D.R., Precopio M.L., Scheinberg P., Alder N.C., Roederer M., Koup R.A., Douek D.C., Hill A.V., McShane H. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺ memory T lymphocyte populations. *Eur. J. Immunol., 2007, vol. 37, pp. 3089–3100. doi: 10.1002/eji.200737504*
7. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhmel J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzenrath M., Suttorp N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature, 2020, vol. 587, pp. 270–274. doi: 10.1038/s41586-020-2598-9*
8. Britten C.M., Janetzki S., Butterfield L.H., Ferrari G., Gouttefangeas C., Huber C., Kalos M., Levitsky H.I., Maecker H.T., Melief C.J.M., O'Donnell-Tormey J., Odunsi K., Old L.J., Ottenhoff T.H.M., Ottensmeier C., Pawelec G., Roederer M., Roep B.O., Romero P., Van der Burg S.H., Walter S., Hoos A., Davis M.M. T cell assays and MIATA: the essential minimum for maximum impact. *Immunity, 2012, vol. 37, no. 1, pp. 1–2. doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.010*
9. Chen J., Liu X., Zhang X., Lin Y., Liu D., Xun J., Wang Z., Gu L., Li Q., Yin D., Yang J., Lu H. Decline in neutralising antibody responses, but sustained T cell immunity, in COVID-19 patients at 7 months post-infection. *Clin. Transl. Immunol., 2021, vol. 10, no. 7: e1319. doi: 10.1002/cti2.1319*
10. Darrah P.A., Patel D.T., De Luca P.M., Lindsay R.W.B., Davey D.F., Flynn B.J., Hoff S.T., Andersen P., Reed S.G., Morris S.L., Roederer M., Seder R.A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. *Nat. Med., 2007, vol. 13, no. 7, pp. 843–850. doi: 10.1038/nm1592*
11. Davis B.H., Dasgupta A., Kussick S., Han J.Y., Estrellado A., Group I.I.W. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS — part II — preanalytical issues. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2013, vol. 84, no. 5, pp. 286–290. doi: 10.1002/cyto.b.21105*
12. Diniz M.O., Mitsi E., Swadling L., Rylance J., Johnson M., Goldblatt D., Ferreira D., Maini M.K. Airway-resident T cells from unexposed individuals cross-recognize SARS-CoV-2. *Nat. Immunol., 2022, vol. 23, no. 9, pp. 1324–1329. doi: 10.1038/s41590-022-01292-1*

13. Guo L., Wang G., Wang Y., Zhang Q., Ren L., Gu X., Huang T., Zhong J., Wang Y., Wang X., Huang L., Xu L., Wang C., Chen L., Xiao X., Peng Y., Knight J.C., Dong T., Cao B., Wang J. SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study. *Lancet, 2022, vol. 3, no. 5, pp. 348–356. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00036-2*
14. Kundu, R., Narean, J.S., Wang, L. Fenn J., Pillay T., Fernandez N.D., Conibear E., Koycheva A., Davies M., Tolosa-Wright M., Hakki S., Varro R., McDermott E., Hammett S., Cutajar J., Thwaites R.S., Parker E., Rosadas C., McClure M., Tedder R., Taylor G.P., Dunning J., Lalvani A. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat. Commun., 2022, vol. 13, no. 1: 80. doi: 10.1038/s41467-021-27674-x*
15. Liu A.Y., De Rosa S.C., Guthrie B.L., Choi R.Y., Kerubo-Bosire R., Richardson B.A., Kiarie J., Farquhar C., Lohman-Payne B. High background in ELISpot assays is associated with elevated levels of immune activation in HIV-1-seronegative individuals in Nairobi. *Immun. Inflamm. Dis., 2018, vol. 6, no. 3, pp. 392–401. doi: 10.1002/iid3.231*
16. Maecker H.T., Rinfret A., D'Souza P., Darden J., Roig E., Landry C., Hayes P., Birungi J., Anzala O., Garcia M., Harari A., Frank I., Baydo R., Baker M., Holbrook J., Ottinger J., Lamoreaux L., Epling C.L., Sinclair E., Suni M.A., Punt K., Calarota S., El-Bahi S., Alter G., Maila H., Kuta E., Cox J., Gray C., Altfeld M., Nougarede N., Boyer J., Tussey L., Tobery T., Bredt B., Roederer M., Koup R., Maino V.C., Weinhold K., Pantaleo G., Gilmour J., Horton H., Sekaly R.P. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol., 2005, vol. 6: 13. doi: 10.1186/1471-2172-6-13*
17. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., Burger Z.C., Rawlings S.A., Smith D.M., Phillips E., Mallal S., Lammers M., Rubiro P., Quiambao L., Sutherland A., Yu E.D., da Silva Antunes R., Greenbaum J., Frazier A., Markmann A.J., Premkumar L., de Silva A., Peters B., Crotty S., Sette A., Weiskopf D. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science, 2020, vol. 370, no. 6512, pp. 89–94. doi: 10.1126/science.abd3871*
18. Moderbacher C.R., Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., , Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., Aravinda de Silva M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell, 2020, vol. 181, no. 7, pp. 1489–1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015*
19. Nelde A., Bilich T., Heitmann J.S., Maringer Y., Salih H.R., Roerden M., Lübke M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Traenkle B., Kaiser P.D., Rothbauer U., Becker M., Junker D., Krause G., Strengert M., Schneiderhan-Marra N., Templin M.F., Joos T.O., Kowalewski D.J., Stos-Zweifel V., Fehr M., Rabsteyn A., Mirakaj V., Karbach J., Jäger E., Graf M., Gruber L.C., Rachfalski D., Preuß B., Hagelstein I., Märklin M., Bakchoul T., Gouttefangeas C., Kohlbacher O., Klein R., Stevanović S., Rammensee H.G., Walz J.S. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat. Immunol., 2021, vol. 22, no. 1, pp. 74–85. doi: 10.1038/s41590-020-00808-x*
20. Nolan S., Vignal M., Klinger M., Dines J.N., Kaplan I.M., Svejnoha E., Craft T., Boland K., Pesesky M., Gittelman R.M., Snyder T.M., Gooley C.J., Semprini S., Cerchione C., Mazza M., Delmonte O.M., Dobbs K., Carreño-Tarragona G., Barrio S., Sambri V., Robins H.S. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCRβ) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. *Research Square, 2020. Version 1. doi: 10.21203/rs.3.rs-51964/v1*
21. Ogbe A., Kronsteiner B., Skelly D.T., Pace M., Brown A., Adland E., Adair K., Akhter H.D., Ali M., Ali S.E., Angyal A., Ansari M.A., Arancibia-Cárcamo C.V., Brown H., Chinnakannan S., Conlon C., de Lara C., de Silva T., Dold C., Dong T., Donnison T., Eyre D., Flaxman A., Fletcher H., Gardner J., Grist J.T., Hackstein C.P., Jaruthamsophon K., Jeffery K., Lambe T., Lee L., Li W., Lim N., Matthews P.C., Mentzer A.J., Moore S.C., Naisbitt D.J., Ogese M., Ogg G., Openshaw P., Pirmohamed M., Pollard A.J., Ramamurthy N., Rongkard P., Rowland-Jones S., Sampson O., Screaton G., Sette A., Stafford L., Thompson C., Thomson P.J., Thwaites R., Vieira V., Weiskopf D., Zacharopoulou P.; Oxford Immunology Network Covid-19 Response T Cell Consortium; Oxford Protective T Cell Immunology for COVID-19 (OPTIC) Clinical Team; Turtle L., Klenerman P., Goulder P., Frater J., Barnes E., Dunachie S. T cell assays differentiate clinical and subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses. *Nat. Commun., 2021, vol. 12, no. 1: 2055. doi: 10.1038/s41467-021-21856-3*
22. O'Hara D.M., Xu Y., Liang Z., Reddy M.P., Wu D.Y., Litwin V. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assays. *J. Immunol. Methods, 2011, vol. 363, no. 2, pp. 120–134. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.036*
23. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., Dejnirattisai W., Rostron T., Supasa P., Liu C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Zhao Y., Stuart D., Paeson G., Grimes J., Antson F., Bayfield O.W., Hawkins D.E., Ker D.S., Turtle L., Subramaniam K., Thomson P., Zhang P., Dold C., Ratcliff J., Simmonds P., de Silva T., Sopp P., Wellington D., Rajapaksa U., Chen Y.L., Salio M., Napolitani G., Paes W., Borrow P., Kessler B., Fry J.W., Schwabe N.F., Semple M.G., Baillie K.J., Moore S., Openshaw P.J., Ansari A., Dunachie S., Barnes E., Frater J., Kerr G., Goulder P., Lockett T., Levin R., Cornall R.J., Conlon C., Klenerman P., McMichael A., Screaton G., Mongkolsapaya J., Knight J.C., Ogg G., Dong T. Broad and strong memory $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol., 2020, vol. 21, no. 11, pp. 1336–1345. doi: 10.1038/s41590-020-0782-6*
24. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J-I., Sönnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 158–168. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017*
25. Shomuradova A.S., Vagida M.S., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova I.O., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Y., Bagaev D.V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A.V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., Khamaganova E.G., Biderman B., Ivanov A.V., Shugay M., Efimov G.A. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors. *Immunity, 2020, vol. 53, no. 6, pp. 1245–1257. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004*
26. Tan C.C.S., Owen C.J., Tham C.Y.L., Bertoletti A., van Dorp L., Balloux F. Pre-existing T cell-mediated cross-reactivity to SARS-CoV-2 cannot solely be explained by prior exposure to endemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol., 2021, vol. 95: 105075. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105075*

27. Tanqri S.,Vall H., Kaplan D., Hoffman B., Purvis N., Porwit A., Hunsberger B., Shankey T.V., Group I.I.W. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS — part III — analytical issues. *Cytometry B. Clin. Cytom., 2013, vol. 84, no. 5, pp. 291–308. doi: 10.1002/cyto.b.21106*
28. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol., 2020, vol. 5, no. 48: eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071*
29. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem., 1993, vol. 39, no. 4, pp. 561–577. doi: 10.1093/clinchem/39.4.561*

**Авторы:**
**Стрижакова О.М.**, к.в.н., научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Першин А.С.**, к.в.н., научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Казаров А.А.**, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Лягоскин И.В.**, к.б.н., руководитель отдела аналитических методов департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Бахарева Я.А.**, химик лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Васильев А.П.**, младший научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Никонова Ю.А.**, научный сотрудник лаборатории биологических методов Отдела Аналитических методов Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Егорова И.Ю.**, руководитель группы диагностических тест-систем Отдела молекулярной диагностики Департамента Фармацевтического Анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Шукуров Р.Р.**, к.б.н., директор департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;
**Хамитов Р.А.**, д.м.н., профессор, вице-президент по исследованиям и разработкам АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия.

**Authors:**
**Strizhakova O.M.**, PhD (Veterinary), Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Pershin A.S.**, PhD (Veterinary), Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Kazarov A.A.**, Senior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Lyagoskin I.V.**, PhD (Biology), Head of the Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Bahareva Ya.A.**, Chemist, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Vasil'ev A.P.**, Junior Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Nikonova Yu.A.**, Researcher, Laboratory of Biological Methods, Analytical Methods Division, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, Russian Federation;
**Egorova I.Yu.**, Head of the Group of Diagnostic Test Systems, Division of Molecular Diagnostics, Department of the Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, poselok Volginsky, 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;
**Khamitov R.A.**, DSc (Medicine), Professor, Vice President of Research and Development, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.12.2022
Отправлена на доработку 19.03.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 07.12.2022
Revision received 19.03.2023
Accepted 21.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 653–662

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 653–662

# РАЗРАБОТКА СТРУКТУРЫ И ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА *E. COLI* ДЛЯ АНТИГЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ БЕЛКОВ N, S, M, E КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

**В.В. Копать[1], А.А. Рябченкова[1], Е.Л. Чирак[1], Е.Р. Чирак[1], А.И. Саенко[1], Н.Н. Колмаков[2], А.С. Симбирцев[3], И.В. Духовлинов[1], А.А. Тотолян[3]**

[1] *ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Т-клеточный иммунный ответ крайне важен при защите организма человека от многих вирусных инфекций. Известно, что он может обеспечить вирусный клиренс и полное выздоровление у пациентов с гуморальным иммунодефицитом. У пациентов с COVID-19 Т-клеточный ответ направлен в основном на структурные белки вируса S, M, N, E, из которых наиболее консервативным является белок нуклеокапсида. Для оценки иммунитета пациентов в отношении коронавирусной инфекции и определения эффективности вакцинных кандидатов необходима разработка оптимального диагностического антигена, используемого для оценки формирования Т-клеточной реакции против антигенных детерминант SARS-CoV-2. Диагностический тест для определения специфической чувствительности организма к инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, должен быть нацелен на консервативные регионы глобальных вариантов SARS-CoV-2. Целью работы была разработка структуры антигена, содержащего консервативные и иммуногенные последовательности структурных белков коронавируса SARS-CoV-2, и получение штамма *Escherichia coli* — продуцента рекомбинантного белка для последующего использования белка в качестве антигена для оценки Т-клеточного противовирусного иммунитета. Создание последовательности антигена проводили *in silico*: TepiTool и NetMHCIIpan использовали для прогнозирования и идентификации высокоаффинных эпитопов, охватывающих белки E, M, N, S SARS-CoV-2 и связывающих МНС II. Было сконструировано несколько вариантов рекомбинантных белков-антигенов, из которых выбрали один на основании его физико-химических свойств: изоэлектрической точки, индекса гидрофобности и алифатического индекса, построенной с помощью I-TASSER 3D модели. Последовательность синтезировали и клонировали в вектор pET24a(+). Полученной плазмидой pCorD_PS последовательно трансформировали штаммы *E. coli* DH5α, затем Rosetta (DE3). Штамм-продуцент рекомбинантного белка *E. coli* CorD_PS проверяли на наличие и стабильность экспрессии белка-антигена индукцией ИПТГ, также оценивали элиминирование плазмиды, кодирующей синтез рекомбинантного коронавирусного антигена. В результате разработан антиген, включающий в себя консервативные участки белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2, на которые может формироваться Т-клеточный иммунный ответ. Для белка массой 53 kDa предсказана стабильность в водных растворах и изоэлектрическая точка 9,56, что

**Адрес для переписки:**
Рябченкова Анастасия Андреевна
199178, Россия, Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, Малый пр. В.О., 57, к. 4, литера Ж, помещение 5-Н, офис 1.2.5, ООО «АТГ Сервис Ген».
Тел.: 8 981 160-63-15.
E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

**Contacts:**
Anastasia A. Riabchenkova
199034, Russian Federation, St. Petersburg, int. ter. municipal district Vasilyevsky, Maly pr. V.O., 57, build. 4, letter Zh, room 5-N, office 1.2.5, LLC "ATG Service Gene".
Phone: +7 981 160-63-15.
E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

**Для цитирования:**
Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Колмаков Н.Н., Симбирцев А.С., Духовлинов И.В., Тотолян А.А. Разработка структуры и штамма-продуцента E. coli для антигена, содержащего последовательности белков N, S, M, E коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 653–662. doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624

**Citation:**
Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A. Designing structure and E. coli strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, M, E protein-related sequence antigen // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 653–662. doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DSA-15624

потенциально позволит упростить процесс очистки белка от нативных белков *E. coli*. Получена плазмидная ДНК pCorD_PS (6695 п.о.), кодирующая клонированный в вектор pET24a(+) синтезированный антиген коронавирусный рекомбинантный. Получен стабильный, продуктивный по коронавирусному рекомбинантному антигену, штамм-продуцент *E. coli* CorD_PS. Полученный штамм — продуцент рекомбинантного антигена *E. coli* CorD_PS стабилен, что позволяет перейти к созданию методики очистки антигена и последующей разработке диагностической тест-системы.

***Ключевые слова:*** *SARS-CoV-2, COVID-19, Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, эпитопы, HLA.*

## DESIGNING STRUCTURE AND *E. COLI* STRAIN-PRODUCER BEARING SARS-CoV-2 N, S, M, E PROTEIN-RELATED SEQUENCE ANTIGEN

**Kopat V.V.[a], Riabchenkova A.A.[a], Chirak E.L.[a], Chirak E.R.[a], Saenko A.I.[a], Kolmakov N.N.[b], Simbirtsev A.S.[c], Dukhovlinov I.V.[a], Totolian A.A.[c]**

[a] *LLC ATG Service-Gene, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*
[c] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** T-cell immune response is extremely important in protecting human body from diverse viral infections. It is known that it can ensure viral clearance and complete recovery in patients with humoral immunodeficiency. COVID-19 patients were found to have T-cell response primarily directed against SARS-CoV-2 structural S, M, N, E proteins, with nucleocapsid protein being most conserved. To assess patients' immunity against coronavirus infection and evaluate an effectiveness of vaccine candidates, it is necessary to develop an optimal diagnostic antigen to evaluate arising T-cell response against SARS-CoV-2 antigenic determinants. A diagnostic test to determine host specific susceptibility to SARS-CoV-2 infection should target conserved regions of global SARS-CoV-2 variants. The study was aimed to develop a structure of an antigen bearing conserved and immunogenic sequences derived from SARS-CoV-2 structural proteins and to obtain an *Escherichia coli* producer strain containing a recombinant protein to be subsequently used for assessing antiviral T-cell immunity. Developing of the antigen was performed *in silico*: TepiTool and NetMHCIIpan were used to predict and identify high affinity epitopes spanning SARS-CoV-2 E, M, N, S proteins and MHC II binding. Several variants of recombinant antigen proteins were constructed, from which one was selected based on its physicochemical properties: isoelectric point, hydrophobicity index and aliphatic index, as well as 3D representation built by using the I-TASSER. The sequence was synthesized and cloned into the pET24a(+) vector. The resulting plasmid pCorD_PS was transformed into *E. coli* DH5α followed by Rosetta (DE3). The strain-producer of the recombinant *E. coli* protein CorD_PS was assessed for the presence and stability of IPTG-induced antigen protein expression and elimination of recombinant coronavirus antigen-bearing plasmid. Based on the study data, an antigen was developed consisting of conserved regions from SARS-CoV-2 S, M, N, E proteins. A 53 kDa recombinant protein was predicted to be stable in aqueous solutions with isoelectric point of 9.56 potentially allowing to simplify protein purification from *E. coli* cells. Plasmid DNA pCorD_PS (6695 bp) encoding final recombinant coronavirus antigen cloned into pET24a(+) vector was obtained. A stable, productive *E. coli* CorD_PS strain was obtained. The obtained strain-producer resulting in recombinant *E. coli* CorD_PS antigen is stable allowing to move on to design antigen purification technique and further develop SARS-CoV-2-specific diagnostic test system.

***Key words:*** *SARS-CoV-2, COVID-19, T cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, epitopes, HLA.*

## Введение

Т-клеточный иммунный ответ играет критическую роль в защите хозяина от многих вирусных инфекций. Внутриклеточная вирусная инфекция стимулирует презентацию вирусных пептидов либо белками HLA класса I $CD8^+$ Т-клеткам (цитотоксические Т-клетки), либо белками HLA класса II $CD4^+$ Т-клеткам [11]. Активация $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток зависит от связывания между антигеном, присутствующим на главном комплексе гистосовместимости (MHC) антигенпрезентирующих клеток, и Т-клеточным рецептором на Т-клетке [30]. В частности, MHC I распознается $CD8^+$ Т-клетками, а MHC II — $CD4^+$ Т-клетками. Оба типа Т-лимфоцитов важны для борьбы с коронавирусами, но в моделях инфицирования SARS-CoV-2 показано, что степень защиты в большей степени зависит от $CD4^+$ Т-клеток. Именно их экспериментальное удаление приводило к блокировке выхода всех типов лимфоцитов в ткань легких, снижению синтеза нейтрализующих антител и цитокинов и значительно снижало вирусный клиренс [5]. Известно, что Т-клеточный иммунный ответ может обеспечить вирусный клиренс и полное выздоровление у пациентов с гуморальным иммунодефицитом [2, 10, 32].

Также было показано, что для инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, характерны: гиперактивация Th17 и нарушения их

субпопуляционного состава; изменения в соотношении «регуляторных» и «провоспалительных» Т-фолликулярных клеток-хелперов [1]; измененный состав подмножества В-клеток, что может быть связано с изменениями в функциональной активности Т-фолликулярных клеток-хелперов [14]; долговременные нарушения в процессах созревания и дифференцировки NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, что может быть связано как с эффективной генерацией подмножества эффекторных клеток, так и с нарушением дифференциации цитотоксических Т-клеток в тимусе [15].

Выявляемый реактивный Т-клеточный ответ у пациентов с COVID-19, ответственный за элиминацию вируса, имеет широкую вариабельную специфичность к различным белкам SARS-CoV-2. Наиболее доминирующие реактивные Т-клетки, включая $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD154^+CD137^+$ и $CD154^+CD137^+$, обнаруженные у выздоровевших пациентов с COVID-19, были специфичны для структурных белков SARS-CoV-2 [5, 10, 11]. В состав вируса SARS-CoV-2 входят четыре белка: E (оболочка), M (мембрана), N (нуклеокапсид) и S (шип) [8]. Из них наиболее консервативным и стабильным является N-белок: большинство эпитопов, специфичных для Т-клеток, сохраняют функциональность в защите от инфекций, вызываемых мутированными вариантами SARS-CoV-2 [20, 30]. Предполагается, что наличие перекрестно-реактивных Т-клеток обеспечивает гетерологичный иммунитет при контакте с неидентичным патогеном [7, 33]. Недавние исследования экспериментально продемонстрировали наличие перекрестно-реактивных Т-клеток при SARS-CoV-2 и SARS-CoV, что указывает на важность гетерологичного иммунитета при инфекции SARS-CoV-2 [9, 19].

Поскольку Т-клеточный иммунитет может обеспечить вирусный клиренс и задействован в механизме иммунной защиты от COVID-19, существует необходимость оценки его функциональности с помощью диагностических систем [21, 28].

В настоящем исследовании мы разработали рекомбинантный коронавирусный антиген на основе полноразмерного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2, дополнительно содержащего Т-клеточные антигенные детерминанты структурных белков (S, E, M) для качественного определения Т-клеточного иммунитета. Данный антиген может стать эффективным инструментом для определения Т-клеточных реакций у пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания и/или оценки иммуногенности кандидатных вакцин в их клинических испытаниях.

## Материалы и методы

*Предсказание/поиск $CD4^+$ Т-клеточных иммуногенных эпитопов SARS-CoV-2 in silico.* Поиск иммуногенных эпитопов проводили в последовательностях структурных белков S, N, M и E SARS-CoV-2 (изолят Wuhan-Hu-1, номер доступа NCBI NC_045512.2) [38]. Выравнивание белковых последовательностей проводили с использованием алгоритма BLAST [3]. TepiTool [24] и NetMHCIIpan [27] использовали для прогнозирования и идентификации высокоаффинных эпитопов, охватывающих белки E, M, N, S SARS-CoV-2 и связывающих MHC II, на основе «панели из 27 наиболее частых аллелей A и B» с включением аллелей HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ. В «методе прогнозирования» — IEDB, выбирали «умеренное количество пептидов», длина эпитопа по умолчанию составляла 15 АК. Пептиды предсказали на основе порогового значения $IC_{50}$, меньшего или равного 1000 нМ. В NetMHCIIpan также предсказали связывание 15 АК пептидов с 27 аллелями MHC II. Были выбраны 0,5%-ные частотные эпитопы на основе прогноза наиболее сильного связывания. Для всех 15 АК пептидов была предсказана их аффинность связывания с 27 молекулами MHC класса II, на долю которых приходится 97% аллельных вариантов HLA-A и HLA-B у большинства этнических групп [29].

*Поиск предсказанных эпитопов SARS-CoV-2 среди экспериментально определенных эпитопов и предсказание связывания отобранных эпитопов с Т-клеточным рецептором.* Отобранные в этом исследовании $CD4^+$ Т-клеточные эпитопы были найдены в базе данных ViPR (https://www.viprbrc.org) путем выбора таких параметров, как семейство *Coronaviridae*, человек-хозяин и экспериментально определенные Т-клеточные эпитопы. Для моделирования связывания Т-клеточных рецепторов с отобранными эпитопами и формирования комплекса эпитоп–MHC II использовали ERGO, который применим как для $CD4^+$, так и для $CD8^+$ Т-клеточных эпитопов [31].

*Анализ физико-химических свойств сконструированных рекомбинантных белков.* Предварительно мы разработали несколько вариантов рекомбинантных коронавирусных антигенов на основе полноразмерного N-белка SARS-CoV-2, ориентируясь на его консервативность и иммуногенность, дополнительно добавив к нему подобранные $CD4^+$ Т-клеточные антигенные детерминанты структурных белков (S, E, M). Структуру сконструированных рекомбинантных белков моделировали с использованием I-TASSER и проверили на сервере RAMPAGE [26]. Физико-химические параметры белков проанализировали с использованием ProtParam [35], изоэлектрическую

точку дополнительно просчитывали с помощью Protein isoelectric point calculator (http://isoelectric.org) [13].

Проводили выравнивание последовательностей, содержащих наиболее иммуногенные участки структурных белков SARS-CoV-2, с помощью BLAST [3] против белков человека, чтобы убедиться в отсутствии сходства полученной гибридной последовательности с последовательностями белков человека и избежать возникновения аутоиммунных реакций при введении антигена.

*Конструирование плазмиды pCorD_PS.* Последовательность гена, кодирующего химерный белок, синтезировали и клонировали в вектор pET24a(+) по сайтам рестрикции: 5' — NdeI, 3' — XhoI. Перед 6×His-меткой дополнительно ввели стоп-кодон. Полученную плазмиду секвенировали на приборе «ABI PRISM 310 GeneticAnalyzer» (Applied Biosystems, США) с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit.

*Создание штамма-продуцента плазмиды pCorD_PS.* Трансформацию компетентных клеток *E. coli* DH5α осуществляли методом электропорации с помощью электропоратора «GenePulser Xcell» (Bio-Rad, США). 1 мкл элюированной с мембранного носителя плазмидной ДНК добавляли к 35 мкл компетентных клеток, перемешивали пипетированием и переносили в стерильные кюветы для электропорации (Bio-Rad, США) объемом 100 мкл, щель 1 мм. Трансформирование производили при электрическом импульсе напряженностью 1,8 кВ длительностью 5 мс. После трансформации клетки помещали в 1 мл среды SOC и инкубировали в течение 40 мин при 37°C в твердотельном термостате «Термит» (ДНК-Технология, Россия), после чего шпателем втирали клетки в чашки Петри с LB-агаром (Gibko BRL, США) и инкубировали в течение ночи в суховоздушном термостате при 37°C (BioSan, Россия). Далее клетки высевали на твердую среду LB-M-агар с добавлением канамицина (50 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение ночи.

Для проверки выросших клонов их пересевали в 50 мл среды LB-M с добавлением канамицина (50 мкг/мл) и инкубировали в роторном шейкере-инкубаторе при 180 об/мин и 37°C в течение ночи. Из 2 мл «ночной» культуры выделяли плазмидную ДНК набором MiniPrep (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

Полученную ДНК рестрицировали эндонуклеазами NdeI и XhoI (NEB, США) согласно протоколу производителя. Дополнительно подлинность плазмиды проверяли путем секвенирования по Сэнгеру. Оценку наличия плазмиды и длины рестрицированных фрагментов проводили путем электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием.

*Конструирование штамма-продуцента Escherichia coli CorD_PS.* Полученную плазмидную ДНК pCorD_PS разводили в 200 раз деионизированной водой и трансформировали ею компетентные клетки *E. coli* Rosetta (DE3) при аналогичных условиях. В результате получили штамм *E. coli* CorD_PS, содержащий плазмиду pCorD_PS. Для хранения клеток смешивали 1 мл ночной культуры и 1 мл стерильного 50% глицерина, переносили в криопробирки и замораживали при –80°C.

Проводили оценку способности синтезировать химерный белок клетками *E. coli* отдельных клонов, содержащих плазмиду pCorD_PS. Ночную культуру клеток клонов выращивали на среде LB-M с добавлением канамицина (50 мкг/мл) в роторном шейкере-инкубаторе при 37°C и 180 об/мин.

К 50 мл свежей среды LB-M с добавлением канамицина (50 мкг/мл) добавляли 1 мл «ночной» культуры, инкубировали в роторном шейкере-инкубаторе при 180 об/мин и 37°C в течение 2 ч. Далее отбирали 1 мл культуры без индукции, добавляли изопропил-β-d-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ, и продолжали индукцию в течение 4 ч.

Оценку экспрессии антигена коронавирусного рекомбинантного анализировали методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле (SDS-PAGE) по методу Лэммли в редуцирующих условиях [17]. Подготовку образцов для электрофореза проводили следующим образом: 1 мл культуры центрифугировали 5 мин при 5000g, супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл 8М мочевины, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, добавляли 30 мкл 4x буфера для образцов (Thermo Fisher Scientific, США), прогревали 10 мин при 99°C, охлаждали и наносили в лунки геля. Полиакриламидный гель окрашивали Кумасси (Coomassie Brilliant Blue R250).

*Оценка стабильности штамма-продуцента E. coli CorD_PS.* Для доказательства стабильности штамма-продуцента *E. coli* CorD_PS провели серию из 9 последовательных пересевов (пассажей) штамма и серию последовательных индукций, в качестве ночной культуры для каждой из которых использовали клетки после 1, 3, 5, 7 и 9 пассажей.

Для проведения индукции экспрессии из замороженных образцов с культурой штамма-продуцента *E. coli* CorD_PS из каждого соответствующего пассажа отбирали по 50 мкл клеточной суспензии и переносили в 50 мл среды LB-M с добавлением канамицина (50 мкг/мл). Клетки растили в роторном шейкере-инкубаторе при 37°C и 180 об/мин в течение. К 50 мл свежей среды LB-M с добавлением канамицина (50 мкг/мл) добавляли 1 мл ночной культуры, инкубировали в шейкере-инкубаторе при 180 об/мин и 37°C

в течение 2 ч. Далее отбирали 1 мл культуры без индукции, добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали индукцию в течение 4 ч. Оценку экспрессии антигена коронавирусного рекомбинантного анализировали методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле аналогичным образом.

Для оценки элиминирования кодирующей плазмиды из 2 мл «ночной» культуры выделяли плазмидную ДНК набором «MiniPrep» (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Полученную плазмидную ДНК рестрицировали (линеаризовали) эндонуклеазой XhoI (NEB) согласно протоколу производителя. Дополнительно подлинность плазмиды проверяли путем ее секвенирования по Сэнгеру. Оценку наличия плазмиды и длины рестрицированных фрагментов проводили путем электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием.

## Результаты

### Разработка кодирующей химерной последовательности антигена

Среди предсказанных *in silico* CD4+ Т-клеточных иммуногенных эпитопов белков E, M, N, S вируса SARS-CoV-2 были отобраны высокоаффинные эпитопы с экспериментальным подтверждением (согласно базе данных ViPR). Далее шел отбор по физико-химическим свойствам. Были отобраны эпитопы с таким суммарным зарядом, чтобы общий заряд химерного белка на основе N-белка SARS-CoV-2 изменялся незначительно при их добавлении. Этот шаг обоснован тем фактом, что теоретически рассчитанная изоэлектрическая точка N-белка SARS-CoV-2 составляет 9,55, что положительно сказывается на отделении рекомбинантного белка от большинства белков штамма-продуцента в ходе очистки. Структура химерного белка, полученная с помощью SnapGene (http://www.snapgene.com), представлена на рис. 1.

Отобранные участки структурных белков включают восококонсервативные эпитопы внутри мутированных штаммов, вызывающих наибольшую обеспокоенность: варианты B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.429, B.1.526, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, AY.1, B.1.618, C.37, B.1.621 и B.1.1.52; включенные эпитопы S-белка соответствуют RBD домену [34]. Соответственно, разрабатываемый диагностикум потенциально универсален.

Разработанный химерный белок состоит из 486 аминокислот и имеет массу 53 059 Da; изоэлектрическую точку pI 9,56; индекс гидрофобности (GRAVY) −0,785; алифатический индекс 61,91; коэффициент экстинкции 53 860 (1 мг/мл раствора белка имеет оптическую плотность 1,02 при длине волны 280 нм). 3D модель белка представлена на рис. 2 (III обложка).

### Структура плазмиды pCorD_PS

Плазмидный вектор pCorD_PS (рис. 3, III обложка) представляет собой вектор pET24a(+), в который по сайтам рестрикции NdeI и XhoI вставлен синтетический фрагмент ДНК размером 1461 п.н., включающий оптимизированную кодирующую часть гена антигена коронавирусного рекомбинантного. При оптимизации гена из последовательности удалили внутренние сайты рекомбинации, сайты связывания рибосомы, AT- и GC-богатые последовательности, повторы и потенциальные вторичные структуры мРНК. Кодонный состав гена адаптировали для *E. coli*.

В результате конструирования рекомбинантного вектора длина плазмиды pCorD_PS составила 6695 п.н. Теоретически ожидаемые длины фрагментов при обработке эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI должны составлять 1463 и 5232 п.н. Практически получены фрагменты, соответствующие ожидаемым (рис. 4).

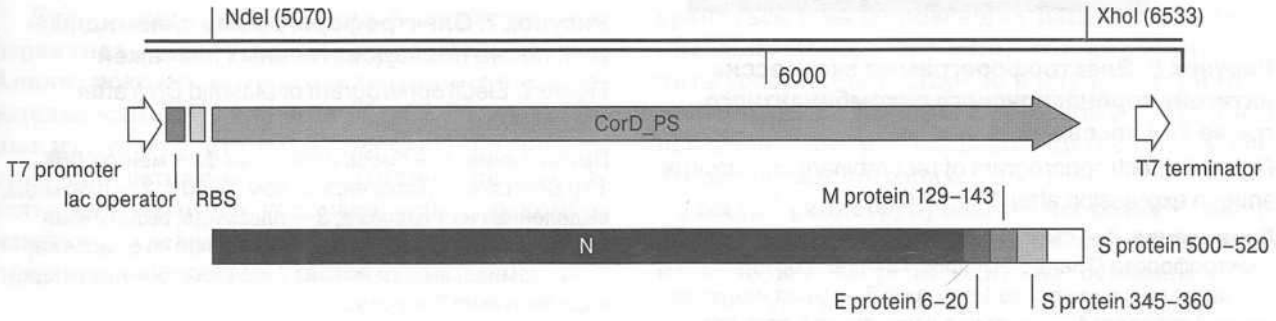


**Рисунок 1. Линейная структура химерного белка**

Figure 1. Linear structure of the chimeric protein

**Примечание.** АК 1–419 — полноразмерный N-белок; АК 420–434 — участок E-белка (АК 6–20); АК 435–449 — участок M-белка (АК 129–143); АК 450–465 — участок S-белка (АК 345–360); АК 466–486 — участок S-белка (АК 500–520).

Note. AA 1–419 — full-length N-protein; AA 420–434 — region of the E-protein (AA 6–20); AA 435–449 — M-protein region (AA 129–143); AA 450–465 — S-protein region (AA 345–360); AA 466–486 — S-protein region (AA 500–520).

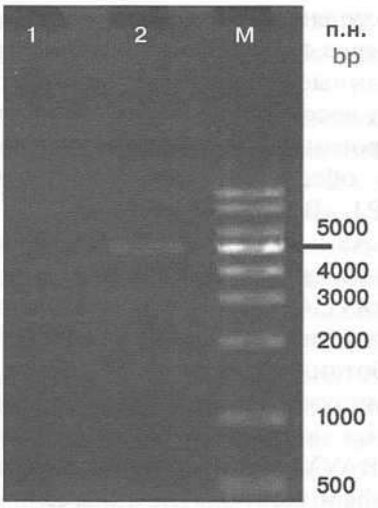


**Рисунок 4. Электрофореграмма рестрицированного вектора pCorD_PS в 1% агрозном геле**

Figure 4. Electropherogram of the restricted vector pCorD_PS in 1% agarose gel

**Примечание.** 1 — pCorD_PS нерестрицированная; 2 — pCorD_PS рестрицированная по сайтам NdeI и XhoI; M — Маркер молекулярного веса ДНК (500–10 000 bp DNA Ladder).

Note.1 — Unrestricted pCorD_PS; 2 — pCorD_PS restricted at the NdeI and XhoI sites; M — DNA Molecular Weight Marker (500–10 000 bp DNA Ladder).

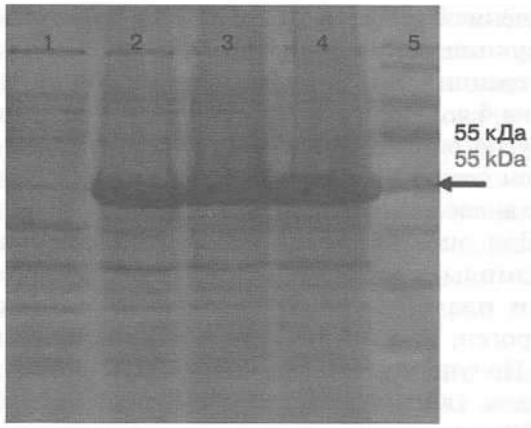


**Рисунок 5. Экспрессия антигена в культурах 3 клонов, индуцированная добавлением 1 мМ ИПТГ, в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях**

Figure 5. Antigen expression in cultures of 3 clones induced with the addition of 1 mM IPTG in 12% polyacrylamide gel under denaturing conditions

**Примечание.** 1 — pCorD_PS — отрицательный контроль (до индукции); 2 — pCorD_PS клон 1; 3 — pCorD_PS клон 2; 4 — pCorD_PS клон 3; 5 — Маркер молекулярного веса белков PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific, кат. ном.26616).

Note. 1 — pCorD_PS — negative control (before induction); 2 — pCorD_PS clone 1; 3 — pCorD_PS clone 2; 4 — pCorD_PS clone 3; 5 — PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific, cat. no. 26616).

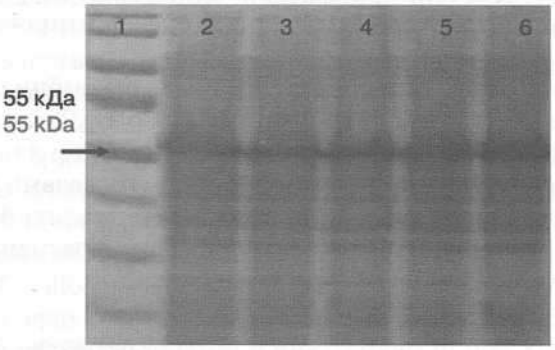


**Рисунок 6. Электрофореграмма экспрессии антигена коронавирусного рекомбинантного после 1–9 пассажей**

Figure 6. Electropherogram of recombinant coronavirus antigen expression after 1–9 passages

**Примечание.** 1 — смесь маркерных белков для электрофореза (Thermo Scientific, кат. ном. 26616), 2 — лизат индукции после 1 пассажа; 3 — лизат индукции после 3 пассажа; 4 — лизат индукции после 5 пассажа; 5 — лизат индукции после 7 пассажа; 6 — лизат индукции после 9 пассажа.

Note. 1 — electrophoresis marker protein mix (Thermo Scientific, cat. no. 26616), 2 — induction lysate after 1 passage; 3 — induction lysate after passage 3; 4 — induction lysate after passage 5; 5 — induction lysate after passage 7; 6 — induction lysate after passage 9.

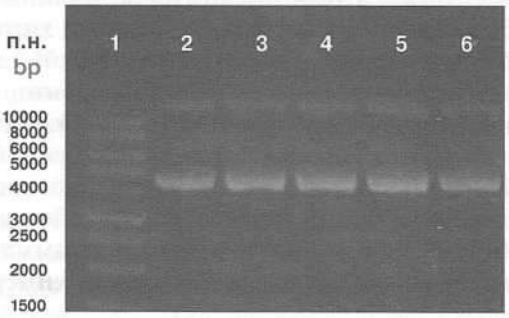


**Рисунок 7. Электрофореграмма плазмидных ДНК после последовательных пассажей**

Figure 7. Electropherogram of plasmid DNA after successive passages

**Примечание.** 1 — смесь маркерных фрагментов ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, кат. ном. NL001); 2 — плазмида, выделенная из 1 пассажа; 3 — плазмида, выделенная из 3 пассажа; 4 — плазмида, выделенная из 5 пассажа; 5 — плазмида, выделенная из 7 пассажа; 6 — плазмида, выделенная из 9 пассажа.

Note. 1 — mixture of marker DNA fragments 1 kb DNA Ladder (Evrogen, cat. no. NL001); 2 — plasmid isolated from passage 1; 3 — plasmid isolated from passage 3; 4 — plasmid isolated from passage 5; 5 — plasmid isolated from passage 7; 6 — plasmid isolated from passage 9.

### Конструирование штамма-продуцента *Escherichia coli* CorD_PS

В результате трансформации компетентных клеток *E. coli* Rosetta (DE3) плазмидой pCorD_PS получили штамм *E. coli* CorD_PS. Для хранения клеток смешивали 1 мл «ночной» культуры и 1 мл стерильного 50% глицерина, переносили в криопробирки и замораживали при –80°C.

Экспрессию белка в культурах 3 клонов, индуцированную добавлением 1 мМ ИПТГ, проанализировали в 12% полиакриламидном геле. Во всех проанализированных клонах после 4 ч индукции обнаружили экспрессию белка, масса которого соответствует теоретически ожидаемой в 53 kDa (рис. 5). Для дальнейшей работы мы выбрали клон № 3.

### Стабильность штамма-продуцента *E. coli* CorD_PS

Продуктивность штамма *E. coli* CorD_PS в течение проведенных 9 пассажей остается неизменной (рис. 6). Интенсивность полос в исследуемых образцах, значение молекулярных весов которых соответствует аллергену коронавирусному рекомбинантному, одинакова для всех пассажей, следовательно, производительность штамма-продуцента в течение 1–9 пассажей остается постоянной.

Плазмида, выделенная из культур после первого, пятого, седьмого, девятого пассажей не имеет различий в молекулярных массах (рис. 7).

Молекулярные массы XhoI рестриктов плазмид, выделенных из штамма продуцента после первого, пятого, седьмого и девятого пассажей, полностью соответствуют молекулярной массе XhoI рестрикта плазмиды pCorD_PS и соответствует теоретически ожидаемой (рис. 8).

Анализ приведенных данных позволяет утверждать, что штамм *E. coli* CorD_PS стабилен. В течение всего процесса ферментации штамма *E. coli* CorD_PS элиминирования плазмиды pCorD_PS, кодирующей синтез аллергена коронавирусного рекомбинантного, не происходит.

Для выделенных плазмид была определена первичная нуклеотидная последовательность. Анализ показал, что все нуклеотидные последовательности ДНК плазмид pCorD_PS, выделенных из культур штамма *E. coli* CorD_PS, полностью соответствуют нуклеотидной последовательности антигена коронавирусного рекомбинантного, следовательно, структура плазмиды при пассажах клеток остается стабильной.

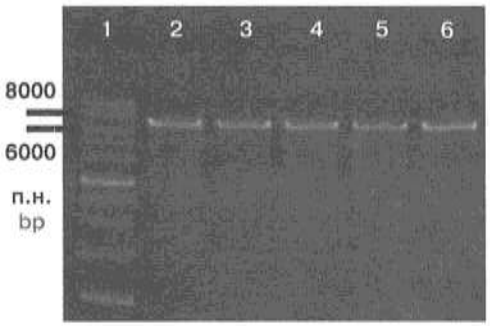


**Рисунок 8. Электрофореграмма рестриктов плазмидных ДНК после последовательных пассажей**

Figure 8. Electropherogram of plasmid DNA restriction after successive passages

**Примечание.** 1 — Смесь маркерных фрагментов ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, кат. ном. NL001); 2 — XhoI рестрикт плазмиды, выделенной из 1 пассажа; 3 — XhoI рестрикт плазмиды, выделенной из 3 пассажа; 4 — XhoI рестрикт плазмиды, выделенной из 5 пассажа; 5 — XhoI рестрикт плазмиды, выделенной из 7 пассажа; 6 — XhoI рестрикт плазмиды, выделенной из 9 пассажа.

Note. 1 — A mixture of marker DNA fragments 1 kb DNA Ladder (Evrogen, Cat. No. NL001); 2 — XhoI restriction plasmid isolated from passage 1; 3 — XhoI restriction plasmid isolated from passage 3; 4 — XhoI restriction plasmid isolated from passage 5; 5 — XhoI restriction plasmid isolated from passage 7; 6 — XhoI restriction plasmid isolated from passage 9.

## Обсуждение

Показано, что специфичный для Уханьского варианта SARS-CoV-2 ответ $CD4^+$ Т-клеток более консервативен против мутированных штаммов, потому что мутации в основном происходят в Т-клеточных эпитопах, отличных от $CD4^+$ [23, 22]. Несмотря на то что мутации происходят в 3% $CD8^+$ Т-клеточных эпитопах, они имеют огромное значение, поскольку даже одной мутации в одном из эпитопов $CD8^+$ Т-клеток HLA достаточно для того, чтобы нарушить и поставить под угрозу распознавание эпитопов HLA, тем самым подавляя активацию, функциональность и цитотоксическую активность Т-клеток $CD8^+$, которые значительно ингибируют разрушение инфицированных клеток-хозяев [9, 25] и в целом влияют на общую эффективность реакции Т-клеток [18, 36]. Т-клеточный иммунный ответ может сохраняться у выздоровевших пациентов в течение длительного времени, что может обеспечить ускоренный клиренс в случае вторичной инфекции SARS-CoV-2. Поэтому в данном исследовании мы сосредоточились на $CD4^+$ Т-клеточных эпитопах.

Было сконструировано несколько вариантов рекомбинантных белков-антигенов, из которых выбрали один на основании его физико-химических свойств. В разработанную в рамках этого исследования многоэпитопную конструкцию мы включили MHC II связывающие эпитопы структурных белков S, M, E SARS-CoV-2 и полноразмерный белок нуклеокапсида как наиболее консервативный внутри семейства *Coronaviridae* и один из наиболее иммуногенных [4].

Отсутствие участков сходства с белками человека потенциально исключает возможные аутоиммунные/аллергические реакции. Алифатический индекс (61,91) свидетельствует о высокой термостабильности глобулярного белка в широком диапазоне температур [12]. Отрицательное значение индекса гидрофобности (–0,785) говорит о гидрофильных свойствах белка [16]. Высокая изоэлектрическая точка полученного химерного белка (9,56) позволяет потенциально упростить процесс хроматографической очистки, так как целевой белок будет иметь заряд, отличный от большей части белков штамма-продуцента *E. coli*. Трехмерная структура белка демонстрирует возможность архитектурной реализации и оптимального сворачивания и самоорганизации молекулы рекомбинантного антигена. Таким образом, наш белок потенциально стабилен в водных растворах.

Мы показали наличие экспрессии сконструированного антигена в клетках *E. coli* при индукции добавлением ИПТГ. Экспрессия остается стабильной при пассировании штамма в жидкой среде (до 9 пассажей) и после заморозки. Неизменной остается и исходная последовательность плазмидной ДНК, кодирующей целевой белок. Полученные результаты свидетельствуют о высокой стабильности штамма-продуцента рекомбинантного белка.

Использование химерной формы антигена (наличие различных иммуногенных участков всех структурных белков коронавируса SARS-CoV-2) расширяет возможности диагностической тест-системы: возможность оценки Т-клеточного иммунного ответа после вакцинации, в том числе теми вакцинами, которые не содержат или не кодируют фрагменты белков коронавируса, на которые формируются оцениваемые существующими диагностикумами на IgG- и IgM-антитела (к примеру, это вакцины, не содержащие полноразмерный S-белок или его RBD-домен).

В результате текущего исследования была разработана генетическая конструкция плазмидной ДНК pCorD_PS (6695 п.о.), кодирующая антиген коронавирусный рекомбинантный, для создания диагностической тест-системы в отношении коронавирусной инфекции. Получен стабильный, продуктивный по коронавирусному рекомбинантному антигену, штамм-продуцент *E. coli* CorD_PS.

Разработанный химерный белок, содержащий иммуногенные $CD4^+$ Т-клеточные эпитопы S, E, M и N структурных белков SARS-CoV-2, может использоваться как диагностикум для качественной оценки специфической иммунной защиты против коронавирусной инфекции и/или оценки иммуногенности кандидатных вакцин в их клинических испытаниях.

На следующих этапах исследований планируется разработать технологию получения очищенного антигена и протестировать использование сконструированного рекомбинантного белка в качестве диагностикума для оценки Т-клеточного противовирусного иммунитета.

## Список литературы/References


1. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тотолян А.А. Т-хелперы и их клетки-мишени при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 409–426. [Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Totolian A.A. T helper cell subsets and related target cells in acute COVID-19. *Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 409–426. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-THC-1882*
2. Bange E.M., Han N.A., Wileyto P., Kim J.Y., Gouma S., Robinson J., Greenplate A.R., Hwee M.A., Porterfield F., Owoyemi O., Naik K., Zheng C., Galantino M., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kugler E.M., Baxter A.E., Oniyide O., Agyekum R.S., Dunn T.G., Jones T.K., Giannini H.M., Weirick M.E., McAllister C.M., Babady N.E., Kumar A., Widman A.J., DeWolf S., Boutemine S.R., Roberts C., Budzik K.R., Tollett S., Wright C., Perloff T., Sun L., Mathew D., Giles J.R., Oldridge D.A., Wu J.E., Alanio C., Adamski S., Garfall A.L., Vella L.A., Kerr S.J., Cohen J.V., Oyer R.A., Massa R., Maillard I.P., Maxwell K.N., Reilly J.P., Maslak P.G., Vonderheide R.H., Wolchok J.D., Hensley S.E., Wherry E.J., Meyer N.J., DeMichele A.M., Vardhana S.A., Mamtani R., Huang A.C. $CD8^+$ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat. Med., 2021, vol. 27, no. 7, pp. 1280–1289. doi: 10.1038/s41591-021-01386-7*
3. Boratyn G.M., Thierry-Mieg J., Thierry-Mieg D., Busby B., Madden T.L. Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics, 2019, vol. 20, no. 1, pp. 1–19. doi: 10.1186/s12859-019-2996-x*
4. Chang C.K., Hou M.H., Chang C.F., Hsiao C.D., Huang T.H. The SARS coronavirus nucleocapsid protein — forms and functions. *Antiviral Res., 2014, vol. 103, pp. 39–50. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.12.009*
5. Chen J., Lau Y.F., Lamirande E.W., Paddock C.D., Bartlett J.H., Zaki S.R., Subbarao K. Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: $CD4^+$ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J. Virol., 2010, vol. 84, no. 3, pp. 1289–1301. doi: 10.1128/jvi.01281-09*
6. DiPiazza A.T., Graham B.S., Ruckwardt T.J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2021, vol. 538, pp. 211–217. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.060*
7. Friberg H., Burns L., Woda M., Kalayanarooj S., Endy T.P., Stephens H.A., Green S., Rothman A.L., Mathew A. Memory $CD8^+$ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol. Cell Biol., 2011, vol. 89, no. 1, pp. 122–129. doi: 10.1038/icb.2010.61*
8. Gordon D.E., Jang G.M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K.M., O'Meara M.J., Rezelj V.V., Guo J.Z., Swaney D.L., Tummino T.A., Hüttenhain R., Kaake R.M., Richards A.L., Tutuncuoglu B., Foussard H., Batra J., Haas K., Modak M., Kim M., Haas P., Polacco B.J., Braberg H., Fabius J.M., Eckhardt M., Soucheray M., Bennett M.J., Cakir M., McGregor M.J.,

Li Q., Meyer B., Roesch F., Vallet T., Mac Kain A., Miorin L., Moreno E., Naing Z.Z.C., Zhou Y., Peng S., Shi Y., Zhang Z., Shen W., Kirby I.T., Melnyk J.E., Chorba J.S., Lou K., Dai S.A., Barrio-Hernandez I., Memon D., Hernandez-Armenta C., Lyu J., Mathy C.J.P., Perica T., Pilla K.B., Ganesan S.J., Saltzberg D.J., Rakesh R., Liu X., Rosenthal S.B., Calviello L., Venkataramanan S., Liboy-Lugo J., Lin Y., Huang X.P., Liu Y., Wankowicz S.A., Bohn M., Safari M., Ugur F.S., Koh C., Savar N.S., Tran Q.D., Shengjuler D., Fletcher S.J., O'Neal M.C., Cai Y., Chang J.C.J., Broadhurst D.J., Klippsten S., Sharp P.P., Wenzell N.A., Kuzuoglu-Ozturk D., Wang H.Y., Trenker R., Young J.M., Cavero D.A., Hiatt J., Roth T.L., Rathore U., Subramanian A., Noack J., Hubert M., Stroud R.M., Frankel A.D., Rosenberg O.S., Verba K.A., Agard D.A., Ott M., Emerman M., Jura N., von Zastrow M., Verdin E., Ashworth A., Schwartz O., d'Enfert C., Mukherjee S., Jacobson M., Malik H.S., Fujimori D.G., Ideker T., Craik C.S., Floor S.N., Fraser J.S., Gross J.D., Sali A., Roth B.L., Ruggero D., Taunton J., Kortemme T., Beltrao P., Vignuzzi M., Garcia-Sastre A., Shokat K.M., Shoichet B.K., Krogan N.J. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature, 2020, vol. 583, no. 7816, pp. 459–468. doi: 10.1038/s41586-020-2286-9*

9. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell, 2020, vol. 181, no. 7, pp. 1489–1501. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015*
10. Gupta S., Su H., Narsai T., Agrawal S. SARS-CoV-2-associated T-cell responses in the presence of humoral immunodeficiency. *Int. Arch. Allergy Immunol., 2021, vol. 182, no. 3, pp. 195–209. doi: 10.1159/000514193*
11. Huang S., He Q., Zhou L. T cell responses in respiratory viral infections and chronic obstructive pulmonary disease. *Chin. Med. J. (Engl.), 2021, vol. 134, no. 13, pp. 1522–1534. doi: 10.1097/CM9.0000000000001388*
12. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem., 1980, vol. 88, no. 6, pp. 1895–1898. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133168*
13. Kozlowski L.P. IPC — isoelectric point calculator. *Biology Direct, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 1–16. doi: 10.1186/s13062-016-0159-9*
14. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Khamitova I.V., Isakov D.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtcov D.E., Totolian A.A. Alterations in B cell and follicular T-helper cell subsets in patients with acute COVID-19 and COVID-19 convalescents. *Curr. Issues Mol. Biol., 2021, vol. 44, no. 1, pp. 194–205. doi: 10.3390/cimb44010014*
15. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous $CD8^+$ T cell maturation and 'polarization' in acute and convalescent COVID-19 patients. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 9: 1906. doi: 10.3390/v14091906*
16. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol., 1982, vol. 157, no. 1, pp. 105–132. doi: 10.1016/0022-2836(82)90515-0*
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0*
18. Lan L., Xu D., Ye G., Xia C., Wang S., Li Y., Xu H. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19. *JAMA, 2020, vol. 323, no. 15, pp. 1502–1503. doi: 10.1001/jama.2020.2783*
19. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham CYL, Hafezi M., Chia A., Chng MHY, Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I., Wang L.F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G., Tan Y.J., Bertoletti A.. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 457–462. doi: 10.1038/s41586-020-2550-z*
20. Matchett W.E., Joag V., Stolley J.M., Shepherd F.K., Quarnstrom C.F., Mickelson C.K., Wijeyesinghe S., Soerens A.G., Becker S., Thiede J.M., Weyu E., O'Flanagan S., Walter J.A., Vu M.N., Menachery V.D., Bold T.D., Vezys V., Jenkins M.K., Langlois R.A., Masopust D. Nucleocapsid vaccine elicits spike-independent SARS-CoV-2 protective immunity. *J. Immunol., 2021, vol. 207, no. 2, pp. 376–379. doi: 10.4049/jimmunol.2100421*
21. Meckiff B.J., Ramírez-Suástegui C., Fajardo V., Chee S.J., Kusnadi A., Simon H., Eschweiler S., Grifoni A., Pelosi E., Weiskopf D., Sette A., Ay F., Seumois G., Ottensmeier C.H., Vijayanand P. Imbalance of regulatory and cytotoxic SARS-CoV-2-reactive $CD4^+$ T cells in COVID-19. *Cell, 2020, vol. 183, no. 5, pp. 1340–1353. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.001*
22. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol., 2022, vol. 23, no. 2, pp. 186–193. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w*
23. O Murchu E., Byrne P., Carty P.G., De Gascun C., Keogan M., O'Neill M., Harrington P., Ryan M. Quantifying the risk of SARS-CoV-2 reinfection over time. *Rev. Med. Virol., 2022, vol. 32, no. 1: e2260. doi: 10.1002/rmv.2260*
24. Paul S., Sidney J., Sette A., Peters B. TepiTool: a pipeline for computational prediction of T cell epitope candidates. *Curr. Protoc. Immunol., 2016, vol. 114, no. 1, pp. 18.19.1–18.19.24. doi: 10.1002/cpim.12*
25. Qiu C., Xiao C., Wang Z., Zhu G., Mao L., Chen X., Gao L., Deng J., Su J., Su H., Fang E.F., Zhang Z.J., Zhang J., Xie C., Yuan J., Luo O.J., Huang L.A., Wang P., Chen G. $CD8^+$ T-cell epitope variations suggest a potential antigen HLA-A2 binding deficiency for spike protein of SARS-CoV-2. *Front. Immunol., 2022, vol. 12: 764949. doi: 10.3389/fimmu.2021.764949*
26. Ramachandran Gn., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol, 1963, vol. 7, pp. 95–99. doi: 10.1016/s0022-2836(63)80023-6*
27. Reynisson B., Barra C., Kaabinejadian S., Hildebrand W.H., Peters B., Nielsen M. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *J. Proteome Res., 2020, vol. 19, no. 6, pp. 2304–2315. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00874*
28. Sauer K., Harris T. An effective COVID-19 vaccine needs to engage T cells. *Front. Immunol., 2020, vol. 11: 581807. doi: 10.3389/fimmu.2020.581807*
29. Sette A., Sidney J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and-B polymorphism. *Immunogenetics, 1999, vol. 50, no. 3–4, pp. 201–212. doi: 10.1007/s002510050594*

30. Smith-Garvin J.E., Koretzky G.A., Jordan M.S. T cell activation. *Ann. Rev. Immunol., 2009, vol. 27, pp. 591–619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706*
31. Springer I., Besser H., Tickotsky-Moskovitz N., Dvorkin S., Louzoun Y. Prediction of specific TCR-peptide binding from large dictionaries of TCR-peptide pairs. *Front. Immunol., 2020, vol. 11: 1803. doi: 10.3389/fimmu.2020.01803*
32. Steiner S., Schwarz T., Corman V.M., Sotzny F., Bauer S., Drosten C., Volk H.D., Scheibenbogen C., Hanitsch L.G. Reactive T cells in convalescent COVID-19 patients with negative SARS-CoV-2 antibody serology. *Front. Immunol., 2021, vol. 12: 2557. doi: 10.3389/fimmu.2021.687449*
33. Su L.F., Kidd B.A., Han A., Kotzin J.J., Davis M.M. Virus-specific CD4+ memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity, 2013, vol. 38, no. 2, pp. 373–383. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.021*
34. Teng I.T., Nazzari A.F., Choe M., Liu T., Oliveira de Souza M., Petrova Y., Tsybovsky Y., Wang S., Zhang B., Artamonov M., Madan B., Huang A, Lopez Acevedo S.N., Pan X., Ruckwardt T.J., DeKosky B.J., Mascola J.R., Misasi J., Sullivan N.J., Zhou T., Kwong P.D. Molecular probes of spike ectodomain and its subdomains for SARS-CoV-2 variants, Alpha through Omicron. *PLoS One, 2022, vol. 17, no. 5: e0268767. doi: 10.1371/journal.pone.0268767*
35. The proteomics protocols handbook. Ed. by Walker J.M. *Humana Press, 2005. 576 p. URL: https://link.springer.com/content/pdf/10.1385/1592598900.pdf (10.07.23)*
36. Wu Y., Guo C., Tang L., Hong Z., Zhou J., Dong X., Yin H., Xiao Q., Tang Y., Qu X., Kuang L., Fang X., Mishra N., Lu J., Shan H., Jiang G., Huang X. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol., 2020, vol. 5, no. 5, pp. 434–435. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30083-2*
37. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics, 2008, vol. 9, pp. 1–8. doi: 10.1186/1471-2105-9-40*
38. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature, 2020, vol. 579, no. 7798, pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7*

**Авторы:**
**Копать В.В.**, директор по развитию ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
**Рябченкова А.А.**, научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
**Чирак Е.Л.**, научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
**Чирак Е.Р.**, научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
**Саенко А.И.**, главный технолог ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
**Колмаков Н.Н.**, научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
**Симбирцев А.С.**, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.
**Духовлинов И.В.**, к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;
**Тотолян А.А.**, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**
**Kopat V.V.**, Development Director, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;
**Riabchenkova A.A.**, Researcher, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;
**Chirak E.R.**, Researcher, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;
**Chirak E.L.**, Researcher, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;
**Saenko A.I.**, Chief Process Engineer, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;
**Kolmakov N.N.**, Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
**Simbirtsev A.S.**, RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Medical Biotechnology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Dukhovlinov I.V.**, PhD (Biology), Director of Science, LLC "ATG Service Gene", St. Petersburg, Russian Federation;
**Totolian A.A.**, RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.08.2023
Принята к печати 13.08.2023

Received 11.08.2023
Accepted 13.08.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 663–674

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 663–674

# FEATURES OF NK CELL PHENOTYPE VIRUS GENOTYPE-DRIVEN CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

**A.A. Savchenko[a], E.P. Tikhonova[b], A.A. Anisimova[c], I.V. Kudryavcev[d,f], V.D. Belenjuk[a], A.G. Borisov[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] *Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation*
[d] *Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St.Petersburg, Russian Federation*
[f] *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Elimination of the hepatitis C virus (HCV) due to direct antiviral drug (DAD) action affects alteration in virus phenotype and, accordingly, NK cell functional activity. However, the published data are very contradictory. The aim of the study was to investigae alterations in NK cell subset phenotype after DAD treatment of HCV genotype-dependent chronic viral hepatitis C (CVHC) patients. *Materials and methods.* 111 CVHC patients and 21 healthy volunteers were examined. The diagnosis was established on epidemiological, clinical and laboratory data. All 111 subjects with CVHC received direct antiviral drugs Sofosbuvir and Velpatasvir for 12 weeks. The study of the NK cell phenotypes wwas analyzed by multicolor flow cytometry. *Results.* A decreased count of cytokine-producing along with increased frequency of cytotoxic NK cells were found in CVHC patients blood samples with various HCV genotypes prior to DAD treatment. The imbalance of cytotoxic cells with a high level of functional activity was also found in CVHC patients regardless of HCV genotype. The patients with HCV genotypes 1 and 3 showed significantly increased level of immunoregulatory NK cells. In addition, increased count of glycohydrolase (CD38) and ecto-5'-nucleotidase (CD73)-expressing NK cells were found in patients with HCV genotypes 1 and 3. Hence, such alterations in NK cell phenotype in CVHC patients were presented as sustained high viral load which peaking at carriers of HCV genotype 1 that was minimal in patients with HCV genotype 2. The most prominent change in NK cells after DAD treatment was found in CVHC patients with HCV genotype 2 (normalization of CD8-expressing NK cell subset composition and count). Only patients with HCV genotype 2 after treatment had increased frequencies of peripheral blood double-negative $CD38^-CD73^-$ NK cells. Patients with HCV genotypes 1 and 3 also showed minimally improved in NK cell subset composition after DAD treatment. *Conclusion.* Evaluation of specific changes in NK cell phenotype during DAD treatment of CVHC patients driven by HCV genotype undoubtedly is of importance and high relevance. The results obtained are novel and complement the insights into CVHC immunopathogenesis. Analysis of NK cell phenotypes and functional activity in patients with CVHC may promote development of new methods for treating HCV infection.

***Key words:*** *chronic viral hepatitis C, hepatitis C virus, genotype, NK cells, phenotype, subsets, treatment.*

**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., Тихонова Е.П., Анисимова А.А., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д., Борисов А.Г. Особенности фенотипа NK-клеток у больных хроническим вирусным гепатитом С в зависимости от генотипа вируса // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 663–674. doi: 10.15789/2220-7619-HCV-8047

**Citation:**
Savchenko A.A., Tikhonova E.P., Anisimova A.A., Kudryavcev I.V., Belenjuk V.D., Borisov A.G. Features of NK cell phenotype virus genotype-driven chronic viral hepatitis C // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 663–674. doi: 10.15789/2220-7619-HCV-8047



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-HCV-8047

# ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА NK-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ВИРУСА

**Савченко А.А.[1], Тихонова Е.П.[2], Анисимова А.А.[3], Кудрявцев И.В.[4,5], Беленюк В.Д.[1], Борисов А.Г.[1]**

[1] *ФГБНУ ФИЦ 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] *Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия*

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

[5] *ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Элиминация вируса гепатита С (ВГС), вызванная действием препаратов прямого противовирусного действия (ППВД), влияет на изменение фенотипа и, соответственно, функциональную активность NK-клеток. Однако имеющиеся в литературе данные весьма противоречивы. Целью настоящего исследования было изучение особенностей изменения фенотипа NK-клеток (с учетом субпопуляционного состава) после лечения больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) ППВД в зависимости от генотипа ВГС. *Материалы и методы.* Обследовано 111 больных ХВГС и 21 здоровый человек в качестве контрольной группы. Диагноз ХВГС устанавливали на основании эпидемиологических и клинико-лабораторных данных при выявлении специфических серологических маркеров хронического гепатита С и РНК ВГС, включая генотипирование ВГС. Все 111 человек с ХВГС получали противовирусные препараты прямого действия (Софосбувир и Велпатасвир) в течение 12 недель. Изучение фенотипа NK-клеток крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами. *Результаты.* В крови больных ХВГС с различными генотипами ВГС до начала лечения ППВД выявлено снижение количества цитокин-продуцирующих и увеличение количества цитотоксических NK-клеток. Дисбаланс цитотоксических клеток с высоким уровнем функциональной активности также был выявлен у больных ХВГС вне зависимости от генотипа ВГС. У пациентов с генотипами 1 и 3 ВГС наблюдалось достоверное увеличение NK-клеток с иммунорегуляторной активностью. Кроме того, у больных ВГС генотипов 1 и 3 выявлено увеличение количества NK-клеток, экспрессирующих гликогидролазу (CD38) и экто-5'-нуклеотидазу (CD73). Результатом выявленных нарушений в фенотипе NK-клеток у больных ХВГС было сохранение выраженной вирусной нагрузки, которая была максимальной при инфицированности генотипом 1 ВГС и минимальной у больных с генотипом 2 ВГС. Наиболее выраженные изменения фенотипического состава NK-клеток после лечения ДАД выявлены у больных ХВГС с генотипом 2 ВГС (нормализация субпопуляционного состава и количества NK-клеток, экспрессирующих CD8). Кроме того, только у больных с генотипом 2 ВГС после лечения наблюдалось повышение содержания дубль-негативных (по CD38 и CD73) NK-клеток в крови. У пациентов с генотипами 1 и 3 ВГС также наблюдалось улучшение состава NK-клеток с различными фенотипами после лечения ДАД, но эти изменения были минимальными. *Выводы.* Оценка особенностей изменения фенотипа NK-клеток при лечении в зависимости от генотипа имеет несомненную значимость и высокую актуальность. Полученные результаты обладают новизной и дополняют информацию об иммунопатогенезе ХВГС. Анализ фенотипов NK-клеток и их функциональной активности у пациентов с ХВГС может помочь в разработке новых методов лечения HCV-инфекции.

***Ключевые слова:*** *хронический вирусный гепатит С, вирус гепатита С, генотип, NK-клетки, фенотип, субпопуляции, лечение.*

## Introduction

Hepatitis C virus (Hepatitis C virus, HCV) is one of the main causes of chronic liver infections in the world. The consequences of chronic viral hepatitis C (CVHC) are highly variable, ranging from minimal histological changes to extensive fibrosis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma [5, 13]. According to available estimates, the number of patients with CVHC in the world is about 180 million people and most patients are unaware of the presence of this infection in them [37]. Treatment of HCV-associated liver injury has improved significantly over the past 20 years [4, 24]. It could be closely linked with our recent data on disease pathophysiology as well as the improvement of methods for diagnostics, treatment and disease prevention.

Currently, there are two main mechanisms of viral infection development. The first one is determined by the pathogenic action of the virus itself against the background of immune disorders associated with a lack of immunity components and/or with a lack of activation for a specific pathogen (tolerance) [1, 2]. The second mechanism is realized by the activation of immune system on virus-infected cells. Consequently, the prognosis of development, the nature of the course and the outcome of an infectious disease vary significantly in depending on the state of the immune system and the characteristics of its response to an infectious pathogen [6, 9].

NK cells (Natural Killer) are defined as a separate population of lymphocytes that perform the functions of innate immunity. Cytolytic activity without prior stimulation of virus-infected and some tumor cells is the initially defined and main function of NK cells [19, 33]. The killer activity of NK cells is regulated by the expression of MHC I molecules. Infected or malignant cells can downregulate MHC I (also known as "missing-self hypothesis"), to become invisible for $CD8^+$ T cells but the loss of MHC I antigens for inhibitory receptors on NK cells sensitizes these cells for NK-mediated killing [12, 29]. However, at present, the regulation of some processes of innate and adaptive immunity is also determined by the function of NK cells which is realized by these cells during functional activation due to the secretion of a wide range of cytokines [7]. Thus, Pallmer K. and Oxenius A. (2016) showed that NK cells stimulated the maturation and activation of dendritic cells, secrete cytokines that promoted the differentiation of 'naïve' Th lymphocytes into Th1 cells [29]. In a study by Anuforo O.U.U. et al. (2018) showed that NK cells maintained apoptosis and regulated the functional activity of neutrophils against the background of antigen-induced inflammation [8]. In this regard, there is a need to study the phenotype of NK cells and the characteristics of their functional activity in patients with CVHC.

A number of studies have shown that the treatment of the disease with direct antiviral drugs (DADs) is effective and allows achieving complete elimination of HCV from the body [4, 30]. However, disturbances in the immune system may persist while levels of inflammation and fibrosis in the liver have been reduced. It was found that the treatment of CVHC patients with DADs led only to a temporary restoration of the functional activity of cells and then the reactivity of these cells decreased significantly below the norm [39]. It is assumed that this phenomenon was determined by the differentiated response of various NK cell subsets to treatment as well as the influence of the changing functional and metabolic state of the liver on the immune system as a whole. In addition, we assume that the change in the phenotype and functional activity of NK cells during DAD treatment may vary depending on the virus genotype.

Thus, the aim of the study was to investigate the features of changes in the NK cell phenotype (including subset composition) after DAD treatment of CVHC patients in depending on the genotype of HCV.

## Materials and methods

*Study participants.* 111 CVHC patients (62 men and 47 women) aged 45.3±15.2 years were examined on the basis of the clinical gastroenterological department of Scientific Research Institute of Medical Problems of the North (Krasnoyarsk). The diagnosis was established on the basis of epidemiological and clinical and laboratory data upon detection of specific serological markers of chronic hepatitis C and HCV RNA according to the recommendations of the European Association for the Study of the Liver (EASL) [14, 15]. Liver fibrosis was studied by shear wave transient elastometry using ultrasound systems Aixplorer (France) or Siemens Acuson S2000 (Germany). Fibrosis was assessed using the METAVIR scale. There were 4 degrees of fibrosis in depending on the indicators of liver elasticity detected: F0 — no fibrosis (≤ 5.8 kPa); F1 — portal and periportal fibrosis without septa (5.9–7.2 kPa); F2 — portal and periportal fibrosis with single septa (7.3–9.5 kPa); F3 — portal and periportal fibrosis with multiple bridging porto-portal and porto-central septa (9.6–12.5 kPa); F4 — cirrhosis (≥ 12.6 kPa).

The HCV RNA content was determined by quantitative real-time PCR on a Biorad CFX96 Real Time System instrument (BioRad Laboratories, USA) using an Abbott RealTime HCV test® test system (Abbott, USA). The HCV genotype was determined using the VERSANT® HCV Amplification 2.0 (LiPA) kit (Siemens, Germany). The degree of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C was assessed using ultrasonic elastography using a Fibroscan 502 device (Echosens, France).

Treatment of patients with CVHC was carried out on the basis of the 2016 EASL recommendations [15]. All 111 examined patients were "naive" (not previously treated with antiviral drugs) and did not have liver cirrhosis (stage F0–F3 by METAVIR). 53 patients with CVHC had HCV genotype 1 (35 patients had liver fibrosis F0–F1 by METAVIR, 9 patients had fibrosis F2 by METAVIR, 9 patients had fibrosis F3 by METAVIR), 9 patients were diagnosed with HCV genotype 2 (3 patients had F0–F1 liver fibrosis according to METAVIR, 3 patients had F2 fibrosis by METAVIR and 3 patients had F3 fibrosis by METAVIR), genotype 3 (subtypes were not determined) HCV was detected in 49 people (25 patients had liver fibrosis F0–F1 by METAVIR, 9 people had F2 fibrosis according to METAVIR and 15 patients had F3 fibrosis by METAVIR). All 111 people with CVHC received direct antiviral drugs Sofosbuvir (400 mg) and Velpatasvir (100 mg) once a day for 12 weeks. Clinical and laboratory control with the determination of the amount of HCV RNA by polymerase chain reaction (PCR) was carried out before the start of treatment, after 4 weeks of therapy, at the end of treatment and 24 weeks after the end of therapy. Drug adherence was assessed using the Morisky–Green Test [10].

The control group included 21 practically healthy individuals who were excluded during the preventive examination of chronic diseases of various organs and systems, including infectious diseases, there were no complaints about the state of health, there were normal indicators of clinical and biochemical blood tests, there were no markers for viral hepatitis B and C in the anamnesis of life, the absence of bad habits (alcohol abuse) was indicated.

All studies were performed with the informed consent of the subjects and in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Association "Ethical principles for conducting scientific medical research involving humans" as amended in 2000 and "Rules of Clinical Practice in the Russian Federation", approved by order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 266 dated June 19 2003.

*Flow cytometry.* The study of the NK cell phenotype was carried out by direct immunofluorescence of whole peripheral blood using monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA) labeled with FITC (fluorescein isothiocyanate), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), APC (allophycocyanin), AA700 (ale-xa fluor 700 ) and AA750 (alexa fluor 750) in the following panel: CD38-FITC/CD94-PE/CD73-ECD/CD56-PC5.5/CD16-PC7/CD8-APC/CD3-AA700/CD45-AA750. The distribution of antibodies along the fluorescence channels was carried out in accordance with the principles of panel formation for multicolor flow cytometry studies [3]. Sample preparation was performed according to the standard procedure [31]. Stained cells were analyzed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., USA) of the Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS". At least 5000 lymphocytes were analyzed for each blood sample. The obtained data were analyzed using the Kaluza software package (Beckman Coulter, Inc., USA).

*Statistical analysis.* The results were presented using the median (Me) and interquartile range as 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles. The significance of differences between the indicators of independent samples (when comparing the indicators of patients with control values) was assessed using the nonparametric Mann–Whitney U test. The significance of differences in indicators in groups of CVHC patients before and after treatment (dependent samples) was determined by the Wilcoxon matched pairs test. Spearman's rank correlation coefficient was calculated to assess the strength of the relationships of the studied indicators. Statistical analysis was carried out using the Statistica 8.0 software package (StatSoft Inc., USA, 2007).

## Results

The level of viral load in CVHC patients is presented in Table 1. It was found that the maximum level of viral load was detected in CVHC patients with HCV genotype 1 but no statistically significant differences in this indicator between patients with different genotypes of HCV were found. Treatment with DADs for 12 weeks in "naïve" patients with CVHC without liver cirrhosis led to a sustained virological response (SVR, determined 6 months after the end of treatment). We didn't find differences in response to drug treatment in CVHC patients with different HCV genotypes. However, 2 patients with HCV genotypes 1 and 2 were identified after treatment with DADs with high levels of viral load (respectively $1.16 \times 10^5$ MU/ml and $0.06 \times 10^5$ MU/ml). The both patients were declared non-compliant after the Morisky-Green test. In this regard, the analysis of the NK cell phenotype characteristics after treatment for these two patients was not performed.

Assessing NK cell level in patients with CVHC, it was found that before the onset of DAD treatment, the percentage of NK cell total fraction ($CD3^-CD56^+CD45^+$) in the blood was reduced in patients with HCV genotypes 1 and 3 compared with control values (Table 2). CVHC patients with HCV genotype 2 during this period of the survey had an increased absolute number of NK cells in the blood relative to the control range. The percentage of $CD56^{bright}CD16^-$ and $CD56^{bright}CD16^+$ NK cells in patients with all three HCV genotypes was reduced while the level of $CD56^{dim}CD16^-$ NK cells was increased compared to control values. At the same time, the most pronounced increase in the percentage of $CD56^{dim}CD16^-$ NK cells was found in patients with HCV genotype 2. A high level of $CD56^{dim}CD16^+$ NK cells relative to control values was found in all patients with CVHC and didn't depend on the HCV genotype. Only patients with HCV genotype 1 before DAD treatment had a reduced number of $CD56^{dim}CD94^+$ NK cells relative to the control level. At the same time, an increase in the number of $CD56^{dim}CD94^+$ NK cells in patients with HCV genotype 2 was found relative to the level detected in patients with HCV genotype 1.

It is known that about 30% of peripheral blood NK cells express the CD8 receptor, the functional activity of such cells is considered high and they demonstrate increased survival in the process of target cell lysis [18, 24]. We found that the maximum (among CVHC patients) percentage of NK cells expressing CD8 ($CD3^-CD56^+CD8^+CD45^+$) before DAD treatment was detected in patients with HCV genotype 2 (Table 3). However, there were practically no differences in the percentage of different subsets of NK cells expressing and not expressing the CD8 marker in CVHC

**Table 1. The level of HCV genotype-driven viral load (MU/ml) in patients with chronic hepatitis C before treatment [Me ($Q_1$–$Q_3$)]**

| Genotypes | Viral load | p |
|---|---|---|
| **Genotype 1** | $2.92 \times 10^5$ ($0.44 \times 10^5$ — $7.62 \times 10^5$) | |
| **Genotype 2** | $0.72 \times 10^5$ ($0.35 \times 10^5$ — $1.56 \times 10^5$) | $p_1 = 0.127$ |
| **Genotype 1** | $1.4 \times 10^5$ ($0.48 \times 10^5$ — $5.20 \times 10^5$) | $p_1 = 0.499$<br>$p_2 = 0.226$ |

**Note.** $p_1$ — significant differences versus patients with HCV genotype 1; $p_2$ — significant differences versus patients with HCV genotype 2.

patients in depending on the HCV genotype. The content of $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{-}$, $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{+}$, $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{-}$ and $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{+}$ NK cells in all patients with CVHC was reduced relative to the control values while the number of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$, $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ and $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{+}$ NK cells was increased. At the same time, the maximum levels of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{-}$ and $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ NK cells were detected in the blood of patients with genotype 2.

**Table 2. HCV genotype-driven NK cell subset composition in patients with chronic hepatitis C before treatment [Me ($Q_1$–$Q_3$)]**

| Parameters | Control n = 21 | Patients with CVHC | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Genotype 1 n = 53 | Genotype 2 n = 9 | Genotype 3 n = 49 |
| $CD3^{-}CD56^{+}CD45^{+}$, % | 11.09 (8.07–17.80) | 9.34 (5.85–12.47) $p_1 = 0.042$ | 10.97 (9.38–20.06) | 8.08 (6.65–12.36) $p_1 = 0.026$ |
| $CD3^{-}CD56^{+}CD45^{+}$, $10^9$/L | 0.17 (0.12–0.27) | 0.21 (0.12–0.28) | 0.28 (0.14–0.72) $p_1 = 0.047$ | 0.19 (0.13–0.25) |
| $CD56^{bright}CD16^{-}$, % | 1.26 (0.63–1.96) | 0.27 (0.14–0.49) $p_1 < 0.001$ | 0.20 (0.09–1.73) $p_1 = 0.046$ | 0.23 (0.12–0.38) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^{+}$, % | 6.67 (4.77–14.45) | 0.35 (0.09–3.23) $p_1 < 0.001$ | 0.43 (0.08–2.23) $p_1 < 0.001$ | 0.51 (0.16–2.07) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^{-}$, % | 0.43 (0.25–1.38) | 1.67 (1.15–3.45) $p_1 < 0.001$ | 4.66 (2.87–8.37) $p_1 < 0.001$ $p_2 = 0.007$ | 1.60 (1.16–2.70) $p_{1,3} < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^{+}$, % | 1.86 (0.80–2.11) | 3.05 (1.39–6.00) $p_1 = 0.006$ | 4.80 (1.49–13.43) $p_1 = 0.036$ | 4.68 (1.60–8.09) $p_1 = 0.002$ |
| $CD56^{bright}CD94^{-}$, % | 0.06 (0.02–1.76) | 0.05 (0.01–0.18) | 0.04 (0.01–0.05) | 0.04 (0.02–0.10) |
| $CD56^{bright}CD94^{+}$, % | 0.24 (0.13–0.74) | 0.36 (0.20–0.54) | 0.41 (0.21–0.55) | 0.35 (0.23–0.52) |
| $CD56^{dim}CD94^{-}$, % | 4.26 (2.52–5.99) | 4.39 (2.76–6.69) | 5.28 (4.46–5.68) | 4.15 (2.93–5.48) |
| $CD56^{dim}CD94^{+}$, % | 6.11 (2.81–8.74) | 3.20 (2.28–5.30) $p_1 = 0.034$ | 5.45 (3.78–7.22) $p_2 = 0.013$ | 4.32 (2.45–6.39) |

**Note.** $p_1$ — significant differences versus control; $p_2$ — significant differences versus patients with HCV genotype 1; $p_3$ — significant differences versus patients with HCV genotype 2.

**Table 3. HCV genotype-driven peripheral blood CD8-expressing NK cell level (in %) in patients with chronic hepatitis C before treatment [Me ($Q_1$–$Q_3$)]**

| Parameters | Control n = 21 | Patients with CVHC | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Genotype 1 n = 53 | Genotype 2 n = 9 | Genotype 3 n = 49 |
| $CD3^{-}CD56^{+}CD8^{-}CD45^{+}$ | 5.44 (4.73–9.27) | 5.24 (3.21–6.96) | 5.95 (3.45–6.67) | 4.95 (3.20–6.78) |
| $CD3^{-}CD56^{+}CD8^{+}CD45^{+}$ | 4.23 (2.40–6.52) | 3.45 (1.81–5.19) | 6.24 (3.46–13.06) $p_2 = 0.030$ | 3.17 (1.94–5.70) $p_3 = 0.029$ |
| $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{-}$ | 0.53 (0.31–0.86) | 0.14 (0.06–0.23) $p_1 < 0.001$ | 0.09 (0.03–0.18) $p_1 = 0.017$ | 0.12 (0.07–0.20) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{+}$ | 0.48 (0.21–0.89) | 0.11 (0.04–0.24) $p_1 < 0.001$ | 0.10 (0.06–0.45) $p_1 = 0.047$ | 0.09 (0.04–0.19) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{-}$ | 3.68 (2.13–4.41) | 0.17 (0.03–1.57) $p_1 < 0.001$ | 0.16 (0.09–0.34) $p_1 < 0.001$ | 0.18 (0.05–0.78) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{+}$ | 2.14 (1.38–5.42) | 0.22 (0.04–1.73) $p_1 < 0.001$ | 0.21 (0.02–1.40) $p_1 = 0.003$ | 0.31 (0.11–1.19) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{-}$ | 0.21 (0.07–0.84) | 1.28 (0.81–2.19) $p_1 < 0.001$ | 2.20 (1.57–2.89) $p_1 < 0.001$ | 1.25 (0.71–1.78) $p_1 < 0.001$ $p_3 = 0.020$ |
| $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ | 0.18 (0.07–0.25) | 0.40 (0.19–0.96) $p_1 = 0.006$ | 3.00 (0.91–5.42) $p_{1+2} < 0.001$ | 0.38 (0.20–0.74) $p_1 = 0.005$ $p_3 < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ | 1.14 (0.44–1.51) | 1.85 (0.74–3.47) $p_1 = 0.012$ | 2.76 (0.91–4.14) $p_1 = 0.048$ | 2.51 (0.54–4.60) $p_1 = 0.031$ |
| $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{+}$ | 0.38 (0.22–0.47) | 1.19 (0.45–2.22) $p_1 < 0.001$ | 1.73 (0.44–9.16) $p_1 = 0.012$ | 1.66 (0.49–3.43) $p_1 < 0.001$ |

**Note.** See footnote to Table 2.

In recent years, studies have appeared that characterize the features of the reactivity of NK cells in the expression of CD38 and CD73 receptors [17, 28]. It was found that the number of $CD56^+CD38^-CD73^-$ and $CD56^+CD38^+CD73^-$ NK cells was reduced in CVHC patients with HCV genotypes 1 and 3 before DAD treatment while the content of $CD56^+CD38^+CD73^+$ NK cells in patients with the same HCV genotypes was increased relative to control values (Table 4). No changes in the number of NK cells expressing CD38 and CD73 markers were found in patients with HCV genotype 2.

Relationships between the number of NK cells with different phenotypes and the level of viral load in patients with CVHC were studied using correlation analysis. It was found that the level of viral load was negatively correlated with the number of $CD56^{dim}CD16^-$ NK cells ($r = -0.32$, $p = 0.016$) and was positively correlated with the content of $CD56^{dim}CD16^-CD8^+$ NK cells ($r = 0.26$, $p = 0.048$) in patients with HCV genotype 1. The level of viral load was only negatively correlated with the number of $CD56^{bright}CD16^-$ ($r = -0.94$, $p = 0.005$) and $CD56^{bright}CD16^+CD8^+$ NK cells ($r = -0.96$, $p = 0.004$) in patients with HCV genotype 2. At the same time, the level of viral load only positively correlated with the number of $CD56^+CD38^+CD73^-$ ($r = 0.30$, $p = 0.035$) and $CD56^+CD38^-CD73^+$ NK cells ($r = 0.38$, $p = 0.007$) in patients with HCV genotype 3.

Some changes in the subset composition of NK cells in CVHC patients persisted even after DAD treatment. Thus, an increased number (relative to control values) of $CD56^{dim}CD16^-$ NK cells was detected in the blood of patients after treatment regardless of HCV genotype (Table 5). It was also found that a low number of $CD56^{bright}CD16^-$ and $CD56^{bright}CD16^+$ NK cells, as well as an increased content of $CD56^{dim}CD16^+$ NK cells, persisted in patients after treatment with HCV genotypes 1 and 3. At the same time, the number of $CD56^{bright}CD16^-$,

**Table 4. HCV genotype-driven peripheral blood CD38- and CD73-expressing NK cell level (in %) in patients with chronic hepatitis C before treatment [Me ($Q_1$–$Q_3$)]**

| Parameters | Control n = 21 | Patients with CVHC | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Genotype 1 n = 53 | Genotype 9 n = 9 | Genotype 3 n = 49 |
| $CD56^+CD38^-CD73^-$ | 2.34 (1.76–5.25) | 1.12 (0.62–2.51) $p_1 < 0.001$ | 1.35 (1.01–6.47) | 1.07 (0.56–1.75) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^+CD38^-CD73^+$ | 0.013 (0.011–0.082) | 0.047 (0.020–0.096) | 0.055 (0.016–0.086) | 0.034 (0.017–0.072) |
| $CD56^+CD38^+CD73^-$ | 7.93 (6.10–15.01) | 5.87 (4.21–8.29) $p_1 = 0.009$ | 7.69 (6.77–13.57) | 5.56 (4.17–8.58) $p_1 = 0.009$ |
| $CD56^+CD38^+CD73^+$ | 0.039 (0.020–0.088) | 0.156 (0.074–0.341) $p_1 = 0.010$ | 0.179 (0.031–0.335) | 0.114 (0.055–0.251) $p_1 = 0.018$ |

**Note.** $p_1$ — significant differences versus control.

**Table 5. HCV genotype-driven peripheral blood NK cell subset composition in patients with chronic hepatitis C after treatment [Me ($Q_1$–$Q_3$)]**

| Parameters | Control n = 21 | Patients with CVHC | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Genotype 1 n = 52 | Genotype 2 n = 8 | Genotype 3 n = 49 |
| $CD3^-CD56^+CD45^+$, % | 11.09 (8.07–17.80) | 13.10 (7.63–15.91) | 18.63 (17.81–22.48) | 9.19 (8.27–12.41) |
| $CD3^-CD56^+CD45^+$, $10^9$/L | 0.17 (0.12–0.27) | 0.30 (0.16–0.46) | 0.40 (0.26–0.66) | 0.21 (0.15–0.30) |
| $CD56^{bright}CD16^-$, % | 1.26 (0.63–1.96) | 0.20 (0.09–0.54) $p_1 < 0.001$ | 0.86 (0.20–3.76) | 0.17 (0.11–0.37) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^+$, % | 6.67 (4.77–14.45) | 0.90 (0.18–4.48) $p_1 < 0.001$ | 8.95 (0.63–15.61) | 1.00 (0.29–6.22) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^-$, % | 0.43 (0.25–1.38) | 1.85 (0.81–3.97) $p_1 < 0.001$ | 1.70 (1.33–6.20) $p_1 = 0.046$ | 2.13 (1.24–2.73) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^+$, % | 1.86 (0.80–2.11) | 3.39 (0.86–6.68) $p_1 = 0.037$ | 4.61 (0.30–14.79) | 3.07 (1.26–6.30) $p_1 = 0.037$ |
| $CD56^{bright}CD94^-$, % | 0.06 (0.02–1.76) | 0.04 (0.02–0.20) | 0.06 (0.03–1.63) | 0.08 (0.02–0.28) |
| $CD56^{bright}CD94^+$, % | 0.24 (0.13–0.74) | 0.29 (0.18–0.51) | 3.74 (0.90–11.61) $p_1 < 0.001$ $p_2 = 0.002$ | 0.42 (0.19–0.75) $p_3 = 0.004$ |
| $CD56^{dim}CD94^-$, % | 4.26 (2.52–5.99) | 5.93 (3.33–8.78) | 6.02 (2.72–6.76) | 5.46 (4.24–6.75) |
| $CD56^{dim}CD94^+$, % | 6.11 (2.81–8.74) | 4.50 (2.52–6.49) | 6.43 (4.25–14.79) | 3.43 (1.87–4.78) $p_1 = 0.015$ |

**Note.** See footnote to Table 2.

$CD56^{bright}CD16^{+}$ and $CD56^{bright}CD94^{+}$ NK cells in the blood of CVHC patients with the HCV genotype 2 after DAD treatment increased significantly compared to the initial (before treatment) values (by Wilcoxon matched pairs test: $p < 0.001$, $p = 0.038$ and $p < 0.001$ accordingly) which led to the normalization of the content of $CD56^{bright}CD16^{-}$ and $CD56^{bright}CD16^{+}$ NK cells and a significant increase in the level of $CD56^{bright}CD94^{+}$ cells relative to control values (see Tables 2 and 5). Only patients with HCV genotype 3 after treatment had a decrease in the level of $CD56^{dim}CD94^{+}$ NK cells relative to control values.

The most pronounced changes in the blood levels of expressing and non-expressing CD8 NK cells after DAD treatment were found in CVHC patients with HCV genotype 2 (Table 6). A statistically significant increase in the number of $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{-}$, $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{+}$, $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{-}$ and $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{+}$ NK cells was found in patients of this group after treatment relative to baseline values: by Wilcoxon matched pairs test: $p = 0.044$, $p = 0.010$, $p = 0.037$ and $p = 0.004$ accordingly (see Tables 3 and 6). This resulted in an increase in the content of cells with these phenotypes to the level of control values. In addition, the number of $CD3^{-}CD56^{+}CD8^{+}CD45^{+}$ cells in the blood of patients with HCV genotype 2 after treatment was increased by almost 3.5 times relative to control values. Almost complete agreement with the initial values in terms of the number of expressing and non-expressing CD8 NK cells was found in patients with HCV genotype 1 after DAD treatment. The only exception was the normalization of the number of $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ NK cells. Normalization of the content of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ and $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ NK cells was also found in patients with genotype 3 after treatment. In addition, an increase in the number of $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{-}$ cells in patients of this group after treatment was detected using the Wilcoxon matched pairs test ($p = 0.045$), but their level still remained below the control. Other features in the number of expressing and non-expressing CD8 NK cells identified before treatment in patients with genotype 3 remained unchanged after DAD treatment.

The number of $CD56^{+}CD38^{+}CD73^{-}$ and $CD56^{+}CD38^{+}CD73^{+}$ NK cells in the blood of CVHC patients with HCV genotype 1 was normalized after DAD treatment while the content of $CD56^{+}CD38^{-}CD73^{-}$ cells remained low relative to the control range (Table 7). Patients with genotype 2 after treatment had the number of expressing and non-expressing CD38 and CD73 NK cells in the norm as well as before treatment. However, the median content of $CD56^{+}CD38^{-}CD73^{-}$ cells was increased in patients of this group after treatment by 5 times compared with the initial level. All changes in the number of expressing and non-expressing CD38 and CD73 NK cells detected in CVHC patients with HCV genotype 3 before treatment were also found by us after DAD treatment.

**Table 6. HCV genotype-driven peripheral blood CD8-expressing NK cell level (in %) in patients with chronic hepatitis C after treatment [Me ($Q_1$–$Q_3$)]**

| Parameters | Control n = 21 | Patients with CVHC | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Genotype 1 n = 52 | Genotype 2 n = 8 | Genotype 3 n = 49 |
| $CD3^{-}CD56^{+}CD8^{-}CD45^{+}$ | 5.44 (4.73–9.27) | 6.72 (3.88–9.78) | 7.38 (3.23–7.43) | 5.50 (4.16–7.26) |
| $CD3^{-}CD56^{+}CD8^{+}CD45^{+}$ | 4.23 (2.40–6.52) | 4.29 (2.47–6.34) | 14.68 (9.77–15.01)<br>$p_1 = 0.012$<br>$p_2 = 0.001$ | 3.29 (2.82–4.87)<br>$p_3 = 0.004$ |
| $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{-}$ | 0.53 (0.31–0.86) | 0.12 (0.04–0.28)<br>$p_1 < 0.001$ | 0.13 (0.09–0.34) | 0.10 (0.06–0.18)<br>$p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^{-}CD8^{+}$ | 0.48 (0.21–0.89) | 0.08 (0.05–0.33)<br>$p_1 < 0.001$ | 0.50 (0.11–3.56)<br>$p_2 = 0.046$ | 0.07 (0.04–0.19)<br>$p_1 < 0.001$<br>$p_3 = 0.041$ |
| $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{-}$ | 3.68 (2.13–4.41) | 0.34 (0.12–2.34)<br>$p_1 < 0.001$ | 0.25 (0.19–5.60) | 0.56 (0.13–2.68)<br>$p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{+}$ | 2.14 (1.38–5.42) | 0.54 (0.08–2.00)<br>$p_1 < 0.001$ | 8.58 (0.43–9.46) | 0.55 (0.11–2.58)<br>$p_1 = 0.005$ |
| $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{-}$ | 0.21 (0.07–0.84) | 1.30 (0.51–3.05)<br>$p_1 < 0.001$ | 1.52 (0.45–2.26) | 1.53 (0.79–2.17)<br>$p_1 < 0.001$ |
| $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ | 0.18 (0.07–0.25) | 0.39 (0.19–1.14)<br>$p_1 = 0.004$ | 0.81 (0.11–3.92) | 0.19 (0.10–0.54) |
| $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ | 1.14 (0.44–1.51) | 1.78 (0.46–4.38) | 2.41 (0.22–4.59) | 1.67 (0.73–4.10) |
| $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{+}$ | 0.38 (0.22–0.47) | 0.95 (0.60–2.75)<br>$p_1 = 0.002$ | 1.74 (0.08–10.16) | 0.92 (0.29–2.54)<br>$p_1 = 0.016$ |

**Note.** See footnote to Table 2.

**Table 7. HCV genotype-driven peripheral blood CD38- and CD73-expressing NK cell level (in %) in patients with chronic hepatitis C after treatment**

| Parameters | Control n = 21 | Patients with CVHC | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Genotype 1 n = 52 | Genotype 2 n = 8 | Genotype 3 n = 49 |
| $CD56^+CD38^-CD73^-$ | 2.34 (1.76–5.25) | 1.76 (0.80–3.40) $p_1 = 0.035$ | 6.75 (0.90–16.48) | 0.98 (0.57–1.78) $p_1 < 0.001$ |
| $CD56^+CD38^-CD73^+$ | 0.013 (0.011–0.082) | 0.036 (0.021–0.076) | 0.038 (0.018–0.072) | 0.027 (0.017–0.059) |
| $CD56^+CD38^+CD73^-$ | 7.93 (6.10–15.01) | 7.60 (4.37–11.12) | 12.65 (5.01–16.84) | 6.58 (5.19–7.86) $p_1 = 0.021$ |
| $CD56^+CD38^+CD73^+$ | 0.039 (0.020–0.088) | 0.101 (0.052–0.218) | 0.412 (0.145–0.678) | 0.132 (0.071–0.243) $p_1 < 0.001$ |

**Note.** $p_1$ – significant differences versus control.

## Discussion

NK cells are a heterogeneous population, have natural cytolytic activity and are capable of producing a wide range of cytokines [12, 19, 33]. We carried out a study of the content of the main fractions of blood NK cells in CVHC patients according to CD16 and CD56 markers. CD16 is a low-affinity G III type immunoglobulin receptor (FcγRIII), which mediates the mechanism of cellular antibody-dependent cytotoxicity [11, 19]. The CD56 marker (NCAM, Leu-19, NKH-1) is a glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily and is involved in the implementation of intercellular contacts [11]. Two main subpopulations of NK cells are distinguished based on the level of CD56 expression. $CD56^{bright}$ NK cells are actively proliferating cells, show minimal cytotoxic activity but intensively synthesize and secrete cytokines such as IFNγ, TNF and GM-CSF [26]. Accordingly, this subset of NK cells is defined as cytokine-synthesizing. There is also evidence that $CD56^{bright}$ NK cells can be defined as regulatory (iNK cells) due to the pleiotropic function of cytokines in various immune and non-immune processes [23, 37]. Cells with the $CD56^{bright}CD16^+$ phenotype are mature NK cells, cells with the $CD56^{bright}CD16^-$ phenotype are defined as less mature and predominantly localized in secondary lymphoid organs (through the expression of CCR7) [22, 23, 35]. The degree of proliferation of $CD56^{dim}$ NK cells in response to activation stimuli is much lower, the cells produce an insignificant amount of cytokines (including IFNγ), but have a high level of cytotoxicity [23]. Accordingly, this subset is defined as cytotoxic. At the same time, the fraction of $CD56^{dim}CD16^-$ cells is characterized as maturing NK cells, cells with the $CD56^{dim}CD16^+$ phenotype predominantly circulate in the blood and, expressing CXCR1, CX3CR1, and ChemR23, migrate to the zones of immune-inflammatory processes [22, 23, 35].

We found that the restructuring of the subset composition of NK cells in CVHC patients before the start of DAD treatment occurred with all three HCV genotypes while patients with genotypes 1 and 3 also had a decrease in the percentage of the total fraction of NK cells and patients with HCV genotype 2 had an increase in the absolute number of NK cells. The restructuring of the subset composition of NK cells was determined by a decrease in the amount of cytokine-producing NK cells ($CD56^{bright}$) in the blood of patients and an increase in the level of cytotoxic cells ($CD56^{dim}$). The revealed changes characterized the reactive reaction of NK cells to HCV infection. The number of mature cytokine-producing cells ($CD56^{dim}CD16^-$) in patients with HCV genotype 2 was minimal in the blood. At the same time, the maximum content of $CD56^{dim}CD16^-$ NK cells was found in patients with HCV genotype 2 (more than 10 times higher than control values). Moreover, it was with this subset of NK cells that the cells with the most pronounced cytotoxic activity was associated [4]. Therefore, a feature is revealed in the reaction of NK cells in CVHC in depending on the genotype of the HCV. It should also be noted that a high level of $CD56^{dim}CD16^-$ NK cells in patients with HCV genotype 1 was associated with an increase in viral load while a low level of $CD56^{bright}CD16^-$ NK cells in patients with HCV genotype 2 correlated with a decrease in viral load (according to the results of correlation analysis). This result determines the low functional activity of NK cells with the $CD56^{dim}$ phenotype (the number of which has been increased) in CVHC patients and the increased significance in the mechanisms of antiviral immunity of cells with the $CD56^{bright}$ phenotype (the number of which has been reduced).

The percentage and absolute number of NK cells in the blood of CVHC patients returned to normal after DAD treatment for all three types of HCV genotype. Against this background, the changes described above in the subset composition of NK cells in patients with HCV genotypes 1 and 3 were completely preserved after treatment. At the same time, patients with HCV genotype 2 after DAD treatment had a complete normalization of cytokine-producing cells of NK cells while the number of cells with the $CD56^{dim}CD16^+$ phenotype also increased to the level of control values. The level of $CD56^{dim}CD16^-$ cells in CVHC patients of this group after treatment remained elevated relative to control values (but already 3.95 times) but was already the lowest compared to the detected number in other HCV genotypes. Accordingly, it can be con-

cluded that a more pronounced improvement in the subset composition of NK cells after DAD treatment was in patients with HCV genotype 2.

We also examined the number of cytokine-producing and cytotoxic NK cells expressing the CD94 marker in the blood of CVHC patients before and after DAD treatment. CD94 is a 30 kDa type II transmembrane glycoprotein belonging to the family of $Ca^{2+}$-dependent lectins (type C) [27]. The CD94 receptor binds to a member of the NKG2 family to form a disulfide-coupled NK cell receptor for class I MHC molecules which have higher specificity than inhibitory/activating killer cell receptors (KIR/KAR) belonging to the Ig superfamily [38]. It has been proven that the level of synthesis of functional molecules (perforins and granzymes) is carried out depending on the expression of the CD94 receptor: $CD94^{+}CD56^{dim}$ NK cells had lower expression levels of granzyme B and perforin and, accordingly, were characterized by a lower level of cellular cytotoxicity than $CD94^{-}CD56^{dim}$ NK cells [38]. When examining patients with CVHC before starting DAD treatment, we found minor changes in the content of blood NK cells expressing the CD94 receptor. Only patients with HCV genotype 1 had low levels (compared with control values and those found in patients with HCV genotype 2) of $CD56^{dim}CD94^{+}$ NK cells. At the same time, after DAD treatment, the content of this fraction of NK cells was already reduced in patients with HCV genotype 3. However, patients with HCV genotype 2 after DAD treatment had a significant increase (more than 15 times compared to control values) in the number of $CD56^{bright}CD94^{+}$ NK cells in the blood. In the Hughes T. et al. (2014) study, NK cells with the $CD56^{bright}CD94^{+}$ phenotype were characterized as IFNγ producing cells with cytolytic activity [20]. Therefore, we can conclude that the treatment of CVHC patients with HCV genotype 2 led to an increase in the functional activity of NK cells.

In recent years, attention has been drawn to the fraction of NK cells expressing the CD8 receptor [16, 25]. It has been proven that $CD8^{+}$ NK cells are highly sensitive to activation stimuli, have an increased level of cytotoxicity, and co-express molecules such as IFNγ, CD107a, TNFα, and MIP-1β [16, 25]. Our examination of CVHC patients showed that the maximum number (but corresponding to control values) of NK cells expressing the CD8 receptor was detected before the start of DAD treatment in patients with HCV genotype 2. In general, changes in the number of NK cells expressing the CD8 receptor relative to control values in CVHC patients with different HCV genotypes before DAD treatment corresponded to the above changes in the content of $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ NK cells: the level of $CD56^{bright}$ cells expressing and non-expressing CD8 was reduced relative to control values, while the number of $CD56^{dim}$ cells expressing and not expressing CD8 was increased. At the same time, patients with genotype 2 had during this period of examination had the maximum number of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{-}$ and $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ NK cells (10.5 and 16.7 times higher than the control level, respectively). Correlation analysis showed no relationship between the content of $CD8^{+}$ NK cells and the level of viral load. A positive correlation was found with the number of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ cells in HCV genotype 1 and a negative correlation with the level of $CD56^{bright}CD16^{+}CD8^{+}$ cells in HCV genotype 2 with the level of viral load which made it possible to once again note the functional insufficiency of NK cells in CVHC patients before the start of DAD treatment.

The number of $CD8^{+}$NK cells in the blood after DAD treatment in CVHC patients with HCV genotypes 1 and 3 remained at the level of control values. At the same time, the content of $CD8^{+}$NK cells in patients with HCV genotype 2 increased after treatment and exceeded the control values by almost 3.5 times. The patients with this genotype after treatment also had changes in the number of $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ NK cells expressing CD8 receptor which brought the content of these cells in the blood in line with the control values. Only the number of $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ NK cells returned to normal in patients with HCV genotype 1 after treatment. At the same time, the number of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ and $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ NK cells in the blood of patients with HCV genotype 3 also returned to normal after treatment. At the same time, the number of $CD56^{dim}CD16^{-}CD8^{+}$ and $CD56^{dim}CD16^{+}CD8^{-}$ NK cells in the blood of patients with HCV genotype 3 also returned to normal after treatment. Consequently, the result of the treatment of CVHC patients was the normalization of the number of individual fractions of NK cells with cytotoxic activity for individuals with genotypes 1 and 3 as well as the restoration to control values of NK cells with cytokine-producing and cytotoxic activity for persons with genotype 2.

Also, the number of NK cells expressing and non-expressing CD38 and CD73 in CVHC patients before and after DAD treatment was studied. CD38 is a about 45 kDa glycoprotein that is expressed on the surface of many cells of the immune system and is defined as a glycohydrolase (EC 3.2.2.6) that catalyzes the degradation of $NAD^{+}$ or $NADP^{+}$ to form cyclic ADP-ribose and nicotinamide [32]. The products of this reaction are necessary for the regulation of the intracellular pool of $Ca^{2+}$. CD38 is involved in the regulation of cellular metabolism through the regulation of the NAD pool and in the pathogenesis of many conditions, including aging, obesity, diabetes, heart disease, asthma, and inflammation. It was shown that the expression of the CD38 receptor on the membrane of NK cells led to a decrease in their functional activity [34]. CD73 (NT5E) is an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) – an enzyme that cleaves adenosine monophosphate (AMP) to adenosine [36]. It has been proven that NK cells expressing CD73 have reduced cytotoxic activity and can implement the functions of regulatory cells [28].

We found a decrease in the number of double-negative NK cells as well as positive for CD38 and negative for CD73 in CVHC patients with HCV genotypes 1 and 3 before the start of DAD treatment. At the same time, the revealed changes in patients HCV genotypes 1 and 3 were manifested in the blood of patients at this stage of the examination against the background of a pronounced increase in the number of double-positive NK cells, that is, cells with the most pronounced regulatory activity. It should also be noted that only patients with HCV genotype 3 had positive correlations between viral load and the number of CD38 and CD73 positive NK cells. Patients with HCV genotype 2 before DAD treatment had no changes in the number of NK cells expressing CD38 and CD73 relative to control values. The patients with HCV genotype 1 after treatment had a normalization of the number of regulatory NK cells and that were positive for CD38 which undoubtedly determined the increase in the functional activity of NK cells. At the same time, there were no changes in the number of NK cells in the blood with the expression of CD38 and CD73 in patients with HCV genotype 3 after the treatment which made it possible to conclude that the immunoregulatory activity of NK cells was preserved in patients of this group. The level of double-negative for CD38 and CD73 NK cells in patients with HCV genotype 2 after treatment increased by 5 times relative to the initial values (but within control range). Consequently, the number of positive for CD38 and CD73 NK cells in CVHC patients before and after DAD treatment differed significantly depending on HCV genotype, and the most pronounced immunoregulatory activity of NK cells was manifested in HCV genotype 3.

It should be noted that data on changes in the phenotype and functional activity of NK cells after DAD treatment of CVHC patients are very contradictory. For example, in the work of Zhang X. et al. (2022) was shown that the functional activity of NK cells was restored during treatment but then decreased to a level below the control values. At the same time, the authors noted (as in our study) the number of $CD56^{dim}$NK cells in patients constantly increased in the course of DAD treatment [39]. At the same time, the study of Jiang H.J. et al. (2019) was showed that the functional activity of NK cells in CVHC patients was restored during DAD treatment due to an increase in the number of $CD56^{bright}$NK cells and a decrease in the content of NK cells expressing the NKG2A receptor [21].

## Conclusion

Thus, a decrease in the number of cytokine-producing and an increase in the number of cytotoxic NK cells was found in the blood of CVHC patients with various HCV genotypes before the start of DAD treatment. Such changes in the subset composition of NK cells can be regarded as a functional response to the persistence of the virus in the body. However, imbalance imbalance of cytotoxic cells with a high level of functional activity was found in CVHC patients regardless of HCV genotype. On the one hand, before DAD treatment, patients had an increase in the number of NK cells expressing the CD8 receptor, on the other hand, there was no increase in the content of terminally differentiated cytotoxic NK cells with a maximum intracellular level of perforins and granzymes ($CD56^{dim}CD94^{-}$). The patients with HCV genotypes 1 and 3 had a significant increase in NK cells with immunoregulatory activity. In addition, an increase in the number of NK cells expressing glycohydrolase (CD38) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) (cells with immunoregulatory function) was found in patients with HCV genotypes 1 and 3. The result of the identified disorders in the phenotype of NK cells in CVHC patients was the preservation of a pronounced viral load which was maximum in HCV genotype 1 and minimal in patients with HCV genotype 2. The most pronounced changes in the phenotypic composition of NK cells after DAD treatment were found in CVHC patients with HCV genotype 2 (normalization of the subset composition and the number of NK cells expressing CD8). In addition, only patients with HCV genotype 2 after treatment had an increase in the content of double-negative (for CD38 and CD73) NK cells in the blood. The patients with HCV genotypes 1 and 3 also had an improvement in the composition of NK cells with different phenotypes after DAD treatment but these changes were minimal. Accordingly, evaluation of the features of changes in the phenotype of NK cells during DAD treatment the CVHC patients in depending on the genotype have of undoubted significance and high relevance. The results obtained are novel and complement the information on the immunopathogenesis of chronic viral hepatitis C. Analysis of the phenotypes of NK cells and their functional activity in patients with CVHC can help in the development of new methods of treating HCV infection.

## References

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В. Особенности иммунного реагирования при вирусных инфекциях // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 2. С. 148–156. [Borisov G.A., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V. Features of the immune response during viral infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 148–156. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2015-2-148-156*
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Тихонова Е.П. Современные методы лечения вирусного гепатита С. Красноярск: НИИ медицинских проблем Севера, 2017. 74 с. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Tikhonova E.P. Modern methods of treating viral hepatitis C. *Krasnoyarsk: Research Institute of Medical Problems of the North, 2017. 74 p. (In Russ.)*]

3. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического 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*
4. Орлова С.Н., Басханова М.В. Эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с недифференцированной дисплазией соединительной ткани // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2019. № 2. С. 61–67. [Orlova S.N., Baskhanova M.V. Efficiency of antiviral therapy for chronic hepatitis c in patients with undifferentiated connective tissue dysplasia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2019, no. 2, pp. 64–67. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2019. 2.61-67*
5. Щаницына С.Е., Бурневич Э.З., Никулкина Е.Н., Филатова А.Л., Моисеев С.В., Мухин Н.А. Факторы риска неблагоприятного прогноза хронического гепатита С // Терапевтический архив. 2019. Т. 91, № 2. С. 59–66. [Shchanitcyna S.E., Burnevich E.Z., Nikulkina E.N., Filatova A.L., Moiseev S.V., Mukhin N.A. Risk factors of unfavorable prognosis of chronic C. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive, 2019, vol. 91, no. 2, pp. 59–66. (In Russ.)] doi: 10.26442/00403660.2019.02.000082*
6. Южанинова С.В., Сайдакова Е.В. Феномен иммунного истощения // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137, № 1. С. 70–83. [Yuzhaninova S.V., Saidakova E.V. Immune exhaustion. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology, 2017, vol. 137, no. 1, pp. 70–83. (In Russ.)*]
7. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol., 2018, vol. 9, pp. 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869*
8. Anuforo O.U.U., Bjarnarson S.P., Jonasdottir H.S., Giera M., Hardardottir I., Freysdottir J. Natural killer cells play an essential role in resolution of antigen-induced inflammation in mice. *Mol. Immunol., 2018, vol. 93, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.molimm.2017.10.019*
9. Badry A., Jaspers V.L.B., Waugh C.A. Environmental pollutants modulate RNA and DNA virus-activated miRNA-155 expression and innate immune system responses: Insights into new immunomodulative mechanisms. *J. Immunotoxicol., 2020, vol. 17, no. 1, pp. 86–93. doi: 10.1080/1547691X. 2020.1740838*
10. Ben A.J., Neumann C.R., Mengue S.S. The brief medication questionnaire and Morisky-Green test to evaluate medication adherence. *Rev. Saude Publica, 2012, vol. 46, no. 2, pp. 279–289. doi: 10.1590/s0034-89102012005000013*
11. Cichocki F., Grzywacz B., Miller J.S. Human NK cell development: one road or many? *Front. Immunol., 2019, vol. 10: 2078. doi: 10.3389/fimmu. 2019.02078*
12. Deng X., Terunuma H. Harnessing NK cells to control metastasis. *Vaccines (Basel), 2022, vol. 10, no. 12: 2018. doi: 10.3390/vaccines10122018*
13. Eldeeb M.K., Magour G.M., Bedair R.N., Shamseya M.M., Hammouda M.A. Study of Dickkopf-1 (DKK-1) in patients with chronic viral hepatitis C-related liver cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *Clin. Exp. Hepatol., 2020, vol. 6, no. 2, pp. 85–91. doi: 10.5114/ceh.2020.95831*
14. European Association for the Study of the Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol., 2018, vol. 69, no. 2, pp. 461–511. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.026*
15. European Association for the Study of the Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J. Hepatol., 2017, vol. 66, no. 1, pp. 153–194. doi: 10.1016/j.jhep.2016.09.001*
16. Fan R., Que W., Liu Z., Zheng W., Guo X., Liu L., Xiao F. Single-cell mapping reveals dysregulation of immune cell populations and VISTA+ monocytes in myasthenia gravis. *Clin. Immunol., 2022, vol. 245: 109184. doi: 10.1016/j.clim.2022.109184*
17. Gao Z., Wang L., Song Z., Ren M., Yang Y., Li J., Shen K., Li Y., Ding Y., Yang Y., Zhou Y., Wei C., Gu J. Intratumoral CD73: an immune checkpoint shaping an inhibitory tumor microenvironment and implicating poor prognosis in Chinese melanoma cohorts. *Front. Immunol., 2022, vol. 13: 954039. doi: 10.3389/fimmu.2022.954039*
18. Geng J., Raghavan M. CD8αα homodimers function as a coreceptor for KIR3DL1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2019, vol. 116, no. 36, pp. 17951–17956. doi: 10.1073/pnas.1905943116*
19. Hashemi E., Malarkannan S. Tissue-resident NK cells: development, maturation, and clinical relevance. *Cancers (Basel), 2020, vol. 12, no. 6: 1553. doi: 10.3390/cancers12061553*
20. Hughes T., Briercheck E.L., Freud A.G., Trotta R., McClory S., Scoville S.D., Keller K., Deng Y., Cole J., Harrison N., Mao C., Zhang J., Benson D.M., Yu J., Caligiuri M.A. The transcription factor AHR prevents the differentiation of a stage 3 innate lymphoid cell subset to natural killer cells. *Cell. Rep., 2014, vol. 8, no. 1, pp. 150–162. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.042*
21. Jiang H.J., Wang X.X., Luo B.F., Cong X., Jin Q., Qin H., Zhang H.Y., Kong X.S., Wei L., Feng B. Direct antiviral agents upregulate natural killer cell potential activity in chronic hepatitis C patients. *Clin. Exp. Med., 2019, vol. 19, no. 3, pp. 299–308. doi: 10.1007/s10238-019-00564-9*
22. Kudryavtsev I., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Vasilyev K., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Dysregulated immune responses in SARS-CoV-2-infected patients: a comprehensive overview. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 5: 1082. doi: 10.3390/v14051082*
23. Lugli E., Marcenaro E., Mavilio D. NK cell subset redistribution during the course of viral infections. *Front. Immunol., 2014, vol. 5: 390. doi: 10.3389/fimmu.2014.00390*
24. Matos J., Paparo F., Bacigalupo L., Cenderello G., Mussetto I., De Cesari M., Bernardi S.P., Cevasco L., Forni G.L., Cassola G., Rollandi G.A. Noninvasive liver fibrosis assessment in chronic viral hepatitis C: agreement among 1D transient elastography, 2D shear wave elastography, and magnetic resonance elastography. *Abdom. Radiol. (NY), 2019, vol. 44, no. 12, pp. 4011–4021. doi: 10.1007/s00261-019-02295-7*
25. McKinney E.F., Cuthbertson I., Harris K.M., Smilek D.E., Connor C., Manferrari G., Carr E.J., Zamvil S.S., Smith K.G.C. A CD8$^+$ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis. *Nat. Commun., 2021, vol. 12, no. 1: 635. doi: 10.1038/s41467-020-20594-2*
26. Michel T., Poli A., Cuapio A., Briquemont B., Iserentant G., Ollert M., Zimmer J. Human CD56$^{bright}$ NK cells: an update. *J. Immunol., 2016, vol. 196, no. 7, pp. 2923–2931. doi: 10.4049/jimmunol.1502570*
27. Murad S., Michen S., Becker A., Füssel M., Schackert G., Tonn T., Momburg F., Temme A. NKG2C$^+$ NK cells for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Int. J. Mol. Sci., 2022, vol. 23, no. 10: 5857. doi: 10.3390/ijms23105857*

28. Neo S.Y., Yang Y., Record J., Ma R., Chen X., Chen Z., Tobin N.P., Blake E., Seitz C., Thomas R., Wagner A.K., Andersson J., de Boniface J., Bergh J., Murray S., Alici E., Childs R., Johansson M., Westerberg L.S., Haglund F., Hartman J., Lundqvist A. CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest., 2020, vol. 130, no. 3, pp. 1185–1198. doi: 10.1172/JCI128895*
29. Pallmer K., Oxenius A. Recognition and regulation of T cells by NK cells. *Front. Immunol., 2016, vol. 7: 251. doi: 10.3389/fimmu.2016.00251*
30. Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J. Hepatol., 2016, vol. 64, no. 2, pp. 486–504. doi: 10.1016/j.jhep.2015.09.011*
31. 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. 4, pp. 637–651. doi: 10.1002/cyto.b.21626*
32. Tarbiah N.I., Alkhattabi N.A., Alsahafi A.J., Aljahdali H.S., Joharjy H.M., Al-Zahrani M.H., Sabban A.M., Alghamdi R.A., Balgoon M.J., Khalifa R.A. T cells immunophenotyping and CD38 overexpression as Hallmarks of the severity of COVID-19 and predictors of patients' outcomes. *J. Clin. Med., 2023, vol. 12, no. 2: 710. doi: 10.3390/jcm12020710*
33. Villalba M., Alexia C., Bellin-Robert A., Fayd'herbe de Maudave A., Gitenay D. Non-genetically improving the natural cytotoxicity of natural killer (NK) Cells. *Front. Immunol., 2020, vol. 10: 3026. doi: 10.3389/fimmu.2019.03026*
34. Viola D., Dona A., Caserta E., Troadec E., Besi F., McDonald T., Ghoda L., Gunes E.G., Sanchez J.F., Khalife J., Martella M., Karanes C., Htut M., Wang X., Rosenzweig M., Chowdhury A., Sborov D., Miles R.R., Yazaki P.J., Ebner T., Hofmeister C.C., Forman S.J., Rosen S.T., Marcucci G., Shively J., Keats J.J., Krishnan A., Pichiorri F. Daratumumab induces mechanisms of immune activation through $CD38^{+}$ NK cell targeting. *Leukemia, 2021, vol. 35, no. 1, pp. 189–200. doi: 10.1038/s41375-020-0810-4*
35. Vujanovic L., Chuckran C., Lin Y., Ding F., Sander C.A., Santos P.M., Lohr J., Mashadi-Hossein A., Warren S., White A., Huang A., Kirkwood J.M., Butterfield L.H. $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ natural killer cell profiling in melanoma patients receiving a cancer vaccine and interferon-α. *Front. Immunol., 2019, vol. 10: 14. doi: 10.3389/fimmu.2019.00014*
36. Wang S., Gao S., Zhou D., Qian X., Luan J., Lv X. The role of the CD39-CD73-adenosine pathway in liver disease. *J. Cell. Physiol., 2021, vol. 236, no. 2, pp. 851–862. doi: 10.1002/jcp.29932*
37. Xie J., Xu B., Wei L., Huang C., Liu W. Effectiveness and safety of Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir as a hepatitis C virus infection salvage therapy in the real world: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Dis. Ther., 2022, vol. 11, no. 4, pp. 1661–1682. doi: 10.1007/s40121-022-00666-0*
38. Yu J., Mao H.C., Wei M., Hughes T., Zhang J., Park I.K., Liu S., McClory S., Marcucci G., Trotta R., Caligiuri M.A. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ human NK-cell subsets. *Blood, 2010, vol. 115, no. 2, pp. 274–281. doi: 10.1182/blood-2009-04-215491*
39. Zhang X., Jiang Y., Li S., Bian D., Liu M., Kong M., Chen Y., Duan Z., Zheng S. Direct-acting antiviral-induced transient recovery of NK cells in early-stage treatment of chronic hepatitis C patients. *J. Clin. Transl. Hepatol., 2022, vol. 10, no. 6, pp. 1117–1124. doi: 10.14218/JCTH.2021.00427*

**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;

**Тихонова Е.П.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом постдипломного образования курсом ПО ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия;

**Анисимова А.А.**, врач инфекционного отделения КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, 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;

**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;

**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;

**Tikhonova E.P.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology with a course of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health of Russia, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Anisimova A.A.**, Physician of Infectious Disease Ward, Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, 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 St. 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;

**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.

Поступила в редакцию 17.03.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 17.03.2023
Accepted 21.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 675–690

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 675–690

# EVOLUTION OF HERD SARS-CoV-2 HUMORAL IMMUNITY IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**A.Yu. Popova[a], V.S. Smirnov[b], S.A. Egorova[b], A.A. Tarasenko[c], A.M. Dashkevich[d], A.M. Milichkina[b], A.L. Skuranovich[d], I.V. Drozd[b], I.N. Glinskaya[d], E.V. Zueva[b], E.O. Samoilovich[e], V.A. Ivanov[b], E.S. Ramsay[b], A.V. Gubanova[b], V.G. Drobyshevskaya[b], O.B. Zhimbaeva[b], O.A. Petrova[b], A.P. Razumovskaya[b], I.A. Karaban[c], T.V. Amvrosieva[e], N.P. Shmeleva[e], L.V. Rubanik[e], A.M. Dronina[e], A.A. Totolian[b]**

[a] *Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[c] *Ministry of Health, Minsk, Republic of Belarus*
[d] *Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus*
[e] *Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus*

**Abstract.** *Background.* The course of the COVID-19 epidemic process depends on population immunity which prevents pathogen spread. Aim: to study an evolution of SARS-CoV-2 humoral immunity in the Belarusian population relative to COVID-19 pandemic dynamics. *Materials and methods.* The work was carried out according to a methodology for assessing herd immunity developed by Rospotrebnadzor (Russia) and the Belarusian Ministry of Health involving the St. Petersburg Pasteur Institute (SPPI) by taking into account the WHO recommendations. The study was approved by the Bioethics Committee of Belarus and the SPPI Bioethics Committee. Participant selection was carried out by questionnaire using a cloud (internet server) service. To monitor herd immunity, a cohort of 4661 subjects (involved at all stages of seromonitoring) was formed from the total volunteer group. Study subjects were randomized into groups based on age (1–17, 18–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69, 70+ years), geographic region, and occupation. For the detection of antibodies (Abs) against SARS-CoV-2 nucleocapsid (Nc) and S glycoprotein receptor-binding domain (RBD), relevant assay systems were used according to the manufacturer's instructions. A four-stage study was conducted according to a unified scheme. *Results.* At stage 1 (pandemic month 15), herd immunity was mainly accounted for by $Nc^+RBD^+$ Ab status alone. By stage 2 (4 months later), its specific proportion decreased by 1.2-fold, whereas percentage of subjects solely bearing RBD-specific Abs increased by 1.7-fold. At stages 3 and 4 (9 and 19 months after the onset) vs. stage 2, percentage of subjects with $RBD^+Nc^-$ decreased by 3.5%; the proportion of persons with $Nc^+RBD^-$ Abs increased by 1.5-fold. The most important contributor in herd immunity turned out to be due to population vaccination, with coverage reaching 70% by stage 4. Among vaccines, compared with whole-virion, inactivated BIBP-CorV vaccine the Sputnik V and Sputnik Light vector were used most often. *Conclusion.* The evolution of herd SARS-CoV-2 humoral immunity included a series of changes in circulating Ab levels (Nc, RBD). The hybrid immunity formed helped to reduce the incidence of COVID-19 to sporadic level.

***Key words:*** *Republic of Belarus, population, SARS-CoV-2, COVID-19, seromonitoring, herd immunity, antibodies, nucleocapsid, receptor binding domain, vaccination, hybrid immunity.*

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

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

**Для цитирования:**
Попова А.Ю., Смирнов В.С., Егорова С.А., Тарасенко Ф.А., Дашкевич А.М., Миличкина А.М., Скуранович А.Л., Дрозд И.В., Глинская И.Н., Зуева Е.В., Самойлович Е.О., Иванов В.А., Рэмзи Э.С., Губанова А.В., Дробышевская В.Г., Жимбаева О.Б., Петрова О.А., Разумовская А.П., Карабан И.А., Амвросьева Т.В., Шмелева Н.П., Рубаник Л.В., Дронина А.М., Тотолян А.А. Эволюция коллективного гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения республики Беларусь // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 675–690. doi: 10.15789/2220-7619-EOH-14440

**Citation:**
Popova A.Yu., Smirnov V.S., Egorova S.A., Tarasenko A.A., Dashkevich A.M., Milichkina A.M., Skuranovich A.L., Drozd I.V., Glinskaya I.N., Zueva E.V., Samoilovich E.O., Ivanov V.A., Ramsay E.S., Gubanova A.V., Drobyshevskaya V.G., Zhimbaeva O.B., Petrova O.A., Razumovskaya A.P., Karaban I.A., Amvrosieva T.V., Shmeleva N.P., Rubanik L.V., Dronina A.M., Totolian A.A. Evolution of herd SARS-CoV-2 humoral immunity in the Republic of Belarus // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 675–690. doi: 10.15789/2220-7619-EOH-14440



**DOI:** http://dx.doi.org/ 10.15789/2220-7619-EOH-14440

# ЭВОЛЮЦИЯ КОЛЛЕКТИВНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА К SARS-CoV-2 СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Попова А.Ю.[1], Смирнов В.С.[2], Егорова С.А.[2], Тарасенко Ф.А.[3], Дашкевич А.М.[4], Миличкина А.М.[2], Скуранович А.Л.[4], Дрозд И.В.[2], Глинская И.Н.[4], Зуева Е.В.[2], Самойлович Е.О.[5], Иванов В.А.[2], Рэмзи Э.С.[2], Губанова А.В.[2], Дробышевская В.Г.[2], Жимбаева О.Б.[2], Петрова О.А.[2], Разумовская А.П.[2], Карабан И.А.[3], Амвросьева Т.В.[5], Шмелева Н.П.[5], Рубаник Л.В.[5], Дронина А.М.[5], Тотолян А.А.[2]**

[1] *Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия*
[2] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологииимени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *Министерство здравоохранения, Минск, Республика Беларусь*
[4] *Республиканский центр гигиены, Минск, Республика Беларусь*
[5] *Республиканский НПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** *Введение.* Судьба эпидемического процесса COVID-19 зависит от популяционного иммунитета, способного предотвратить распространение возбудителя среди населения. *Цель.* Исследовать эволюцию популяционного гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 населения Беларуси в динамике пандемии COVID-19. *Материалы и методы.* Работу проводили по методологии оценки популяционного иммунитета к SARS-CoV, разработанной Роспотребнадзором России и Министерством здравоохранения Беларуси при участии НИИЭМ им. Пастера с учетом рекомендаций ВОЗ. Исследование одобрено комитетом по биоэтике Беларуси и локальным этическим комитетом НИИЭМ им. Пастера. Отбор участников проводили методом анкетирования с помощью технологии «облачного сервиса». Для проведения мониторинга популяционного иммунитета из общего числа волонтеров формировали когорту в составе 4661 человека, участвовавших в обследовании на всех этапах серомониторинга. Волонтеров рандомизировали по возрастным группам: 1–17; 18–29; 30–39; 40–49; 50–59; 60–69; 70+ лет, а также по территориальному и профессиональному признакам. Для определения антител к нуклеокапсиду (Nc Abs) и рецептор-связывающему домену (RBD Abs) гликопротеина S SARS-CoV-2 применяли соответствующие тест-системы в соответствии с инструкциями производителей. Исследование проводилось в 4 этапа по единой схеме. Полученные результаты обрабатывали с использованием статистического пакета Excel 2010, и другими программными продуктами. Статистическую значимость различий оценивали с вероятностью $p < 0,05$, если не указано иначе. *Результаты.* На 1-м этапе (15 месяц пандемии) популяционный иммунитет был обусловлен преимущественно только $Nc^+RBD^+$ Abs. Ко 2-му этапу, проведенному через 4 мес. их доля сократилась в 1,2 раза, но увеличились доля волонтеров, содержавших только RBD Abs в 1,7 раза. На 3-м и 4-м этапах, проведенных через 9 и 19 мес., доля лиц с $RBD^+Nc^-$ по сравнению со 2-м этапом на 3,5%, доля лиц с $Nc^+RBD$ Abs увеличилась в 1,5 раза. Важнейшим фактором популяционного иммунитета стала вакцинация населения, охват которой к 4-му этапу достиг 70%. Среди вакцин чаще всего использовали векторные Спутник V и Спутник Light, реже — цельновирионную инактивированную BIBP-CorV. *Заключение.* Эволюция популяционного гуморального иммунитета против SARS-CoV-2 включала совокупность изменений уровней циркулирующих Nc, RBD и $Nc^+RBD$ Abs. Сформировавшийся гибридный иммунитет способствовал снижению заболеваемости до спорадического уровня.

***Ключевые слова:*** *Республика Беларусь, население, SARS-CoV-2, COVID-19, серомониторинг, популяционный иммунитет, антитела, нуклеокапсид, рецептор связывающий домен, вакцинация, гибридный иммунитет.*

## Introduction

Among the vast family of viruses that periodically cause infectious illness in humans, coronaviruses did not initially attract much attention. Isolated in 1965 from a person with acute coryza, they have long been associated with a mild, self-limiting upper respiratory tract infection. Four types of seasonal coronaviruses have been known to be associated with common cold infection in humans: two alpha (229E, OC43) and two beta (NL63, HKU1) [2, 3]. The situation began to change starting in 2002, when the first highly pathogenic strain of coronavirus emerged, causing a SARS outbreak of more than 8400 cases. Subsequently, this virus was named SARS-CoV [37].

Ten years later, another pathogenic Betacoronavirus representative appeared in the Middle East: the causative agent of Middle East Respiratory Syndrome (MERS). It caused 1348 infections from 2012–2015, in which 479 people died [4, 23, 37, 46]. The evolution of pathogenic coronaviruses continued at the end of 2019, on December 31 specifically, when a cluster of SARS patients was detected in a fish market in the Chinese city of Wuhan. It was caused by a new Betacoronavirus representative, SARS-CoV-2, causing a pandemic of acute respiratory infection pandemic (COVID-19) now in its third year [32, 42, 45].

According to statistical sources, 630 164 738 people have been infected globally, including 6 577 479 deaths (as of October 14, 2022) [14, 44]. A characteristic feature of SARS-CoV-2 is relatively rapid viral evolution due to a rather high mutational variability [19, 39]. Thus, the original Wuhan viral line (2019-nCoV) was replaced by a new variant: B.1.1.7 (Alpha type), first isolated on September 20, 2020 in the UK [25]. In the same year, a variant, B.1.351

(Beta type) [22], was identified in S. Africa (May 20). In November, a new variant, B.1.1.28 (P.1), was identified in Brazil, designated as the Gamma viral line [7]. Around the same time, a virus was isolated in India, designated as B.1.617.2 (Delta variant) [28]. The latest virus was B.1.1.529, better known as the Omicron variant, which was identified in November 2021 simultaneously in S. Africa and Botswana; it circulated at least until the end of 2022 [20, 24]. All of the aforementioned coronavirus variants were classified as variants-of-concern (VOC) [44]. In addition to them, however, there are 7 additional, less pathogenic, strains. These did not show significance in the pandemic process and were quickly forced out of circulation by more pathogenic representatives.

In the Republic of Belarus (RB), the COVID-19 pandemic turned out to be less widespread than in neighboring countries, such as Russia for example [12]. As of 14/10/2022, 994 037 individuals have been infected in the RB, of which 7118 (0.7%) have died. In terms of incidence, the Republic ranks 65th among nations globally. At the same time, like other countries globally, it was not bypassed by the well-known SARS-CoV-2 lines that appeared in circulation [9]. By comparing the ordering of SARS-CoV-2 variants and recorded peaks in morbidity, it was possible, with some degree of probability, to predict the chronological sequence of the listed variants appearing in circulation in the RB (Fig. 1). At the same time, it should be noted that each subsequent viral variant caused a wave of increased incidence in the RB, often 3–4 months later than peaks in many other countries.

The first COVID-19 case was detected only in the 9th week of 2020, that is, at the end of the 2nd month after the first case was detected in Wuhan [9]. The Alpha SARS-CoV-2 variant was identified in the UK in September 2020, but only in February 2021 did it start circulating in the RB. Similarly, the most transmissible Omicron variant was initially isolated in S. Africa in September 2021, but its rapid, albeit short-lived, spread in RB was not seen until January 2022 (Fig. 1). Thus, the epidemic situation in the RB can be characterized by several features: relatively low population density (45.5 km$^2$); later appearance of new SARS-CoV-2 genetic variants in circulation; and relatively low morbidity, not exceeding 600‰ (Fig. 1), with mortality varying within 0.7%.

For comparison, in Poland (as of May 5, 2022): pop. density was 121.2 km$^2$; morbidity was 15 834‰; and COVID-19 mortality was 1.9%. In neighboring Ukraine (pop. density 75.6 km$^2$), morbidity was 12 152‰, and the COVID-19 mortality rate was 2.17%. In Hungary (pop. density 103.3 km$^2$), morbidity was 19 803‰, and the mortality rate reached 2.4%. In Lithuania (pop. density 40.6 km$^2$), morbidity was unexpected high (39 949‰), and the mortality rate was 0.9% [12, 13].

Another factor likely preventing intense spread of SARS-CoV-2 among the Belarusian population was

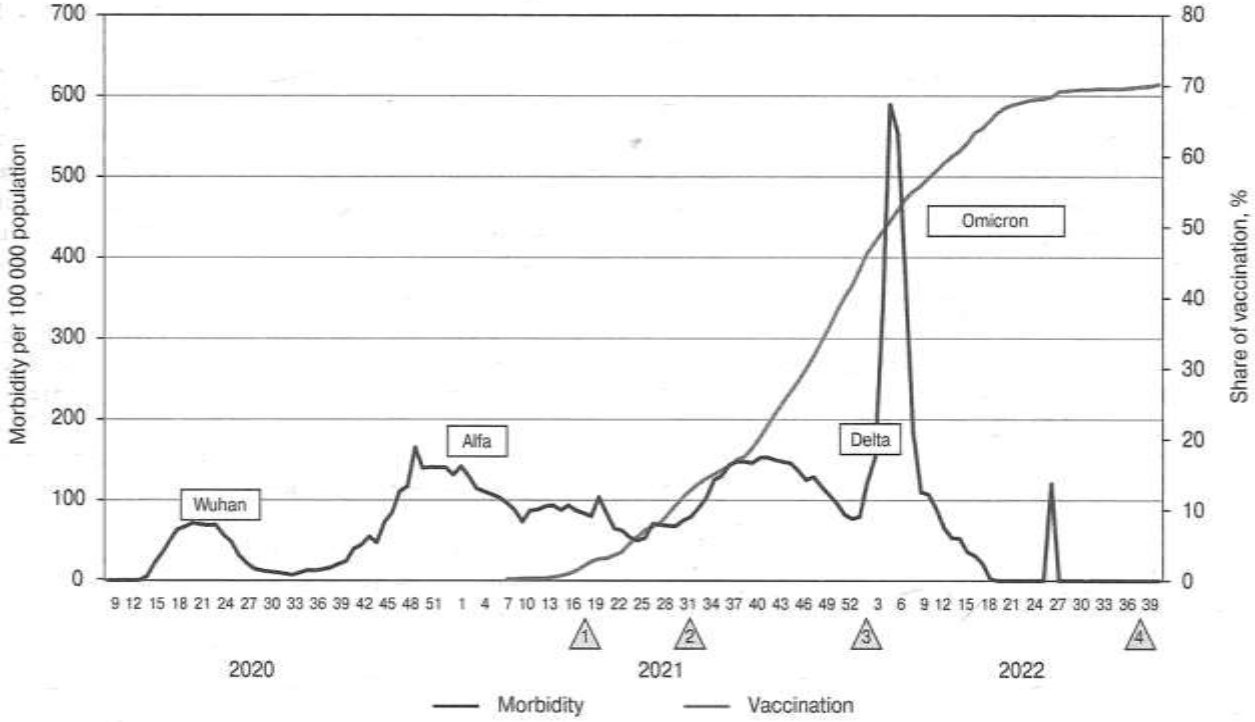


**Figure 1. Evolution of COVID-19 morbidity and vaccination dynamics in the Belarusian population**
**Note.** Black line — morbidity throughout the COVID-19 epidemic among the Belarusian pop.; rectangles — actual SARS-CoV-2 variants circulating over different periods; grey line — the share of people who have completed vaccination; left vertical axis — morbidity per 100 000 pop.; right vertical axis — the proportion of people who have completed full vaccination; horizontal axis — week of the year; triangles — demarcate stages I through IV of seromonitoring.

substantial seroprevalence. According to a cross-sectional study to assess population immunity in Belarus, the average level of seroprevalence for SARS-CoV-2 N protein Abs was 47.1% already by May 2021 (95% CI: 46.3–48.0) [30]. Vaccination against pathogenic coronavirus was launched in the first half of 2021 and actively carried out in the Republic. This undoubtedly became a decisive prerequisite for increasing the level of population immunity. Indeed, a noticeable decrease in COVID-19 morbidity was observed in the second half of 2022 (Fig. 1).

It should also be noted that booster re-vaccination was launched among the population starting from the 40th week of 2021. In result, vaccine coverage of the population had reached almost 70% of the threshold starting from the 19th week of 2022. A sharp decrease in incidence to only sporadic levels immediately followed. This is fully consistent with existing theories which assert that achievement of 70% seroprevalence represents a threshold leading to interruption of pathogen transmission [31, 33]. This fact likely explains certain dynamics: the weak collective response to the introduction of the Delta variant into the RB; and the brief peak in morbidity associated with circulation of Omicron B1.1.529 strains (Fig. 1).

Of course, in parallel with changes in coronavirus genetic variants, humoral immunity in the population inevitably evolved as well. When analyzing the COVID-19 morbidity curve alongside vaccination dynamics, we notice a clear relationship. Specifically, the formation of population immunity exerted a dominant, positive influence leading to the suppression, and then the cessation, of the epidemic process among the population (Fig. 1). Analysis of the evolution of SARS-CoV-2 collective immunity in the Belarusian population, in the context of the COVID-19 epidemic (second half of 2020 and the first 10 months of 2022), was the main goal of this randomized longitudinal study.

## Materials and methods

*Formation of the volunteer cohort.* A study to assess the formation and progression of SARS-CoV-2 collective immunity in the Belarusian population was implemented in 4 stages over 2021–22 (Fig. 1). The 1st stage was carried out (May 14–19, 2021) with 12 929 individuals taking part in the survey. In the 2nd stage (Aug. 30 — Sept. 3, 2021), the number of examined individuals decreased by 28%, leaving to 9269 people. By the 3rd stage (Jan. 24–28, 2022), the cohort of examined persons decreased by another 11.6%, leaving 8189. In the final 4th stage (Oct. 10–14, 2022), the surveyed cohort size was 5755; some in this group had missed the 2nd and/or 3rd stages. To obtain comparable results, only those individuals who participated in all stages of monitoring were selected from the general cohort. These totaled 4661 people, and their results were used for subsequent analysis.

**Table 1. Age structure of the volunteer cohort**

| Age group, years | Analyzed | |
|---|---|---|
| | Individuals | Share of the cohort, % |
| 1–17 | 547 | 11.7 |
| 18–29 | 406 | 8.7 |
| 30–39 | 664 | 14.2 |
| 40–49 | 820 | 17.6 |
| 50–59 | 793 | 17.0 |
| 60–69 | 704 | 15.1 |
| 70+ | 727 | 15.6 |
| Total | 4661 | 100 |

All studies were carried out exclusively on a voluntary basis in which each volunteer (or their legal representative) was familiarized with the study's aims and conditions. The study was conducted in strict accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki. Prior to the start of the cross-sectional study, the design was approved by the Bioethics Committee of the RB (protocol No. 2, dated May 13, 2021) and the local ethics committee of the St. Petersburg Pasteur Institute (Proceedings No. 64, dated May 26, 2020).

All volunteers included in the cohort were clinically healthy. The exclusion criterion was: signs of manifest COVID-19 during the survey period. Our methodology for cohort formation and examination has been exhaustively described earlier [1, 27, 30,]. Over the course of four stage examination of individuals in the final cohort, antibodies (Abs) to two main antigens (Ags) were determined in volunteer sera according to previously described methods [29, 30]. These were Abs to nucleocapsid (Nc) and to S protein receptor-binding domain (RBD). To obtain comparable results, volunteers were randomized during cohort formation by age and region (Tables 1, 2). Randomization by age yielded a cohort profile similar to the age structure of the Belarusian population [40].

Upon regional randomization, the greatest volunteer representation was from Minsk (the capital and most populous city) and the Mogilev region. The least was from the Gomel region. In other administrative regions, representation was relatively uniform. Thus, based on the randomization performed, the distribution of volunteers by age and region satisfactorily corresponded to demographic criteria (Table 2) [40].

Some of volunteers participated in coronavirus vaccination deployed in the RB. In the 1st stage, 1168 people in the cohort were vaccinated. Of these, 85.3% received the Gam-COVID-Vac vector vaccine (Sputnik V, Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia), and 14.7% received the inactivated BBIBP-CorV vaccine (Sinopharm Group Co., Ltd., Shanghai, PRC). By the second stage, 1179 volunteers were vaccinated, with 85.3% receiving the Sputnik V vaccine, 14.0% receiving BBIBP-CorV, and about 1% receiv-

ing other vaccines. By the 3rd stage, another 1371 volunteers had been vaccinated. At the same time, the share immunized with Sputnik V vaccines was 87.2%, and the share vaccinated with BBIBP-CorV was 12.7%. In the 4th stage, 1196 people were vaccinated, with 85.4% receiving Sputnik V and 14.5% receiving BBIBP-CorV.

*Statistical analysis.* The data obtained were processed using Excel 2010. Confidence intervals (95% CI) were calculated according to the method of A. Wald and J. Wolfowitz [43], with the corrections of A. Agresti and B.A. Coull [5]. Correlation analysis was performed using the Spearman rank correlation method. The statistical significance of differences was calculated by z-test using a corresponding online calculator [38]. The statistical significance of differences, unless otherwise indicated, was assessed with a probability $p \leq 0.05$.

## Results

*Characteristics of the COVID-19 epidemic process over the seromonitoring period.* The cohort of volunteers who took part in all stages of Ab seroprevalence assessment in the Belarusian population during the COVID-19 pandemic was, as indicated, 4661 individuals. The first stage was conducted from May 14 to 19, 2021 (weeks 19–20). During this period, there was a small peak in morbidity within 88‰. The B.1.1.7 (Alpha) viral variant circulated predominantly in the country, yet without causing a significant increase in morbidity, which did not exceed 100‰.

The second stage of monitoring (30.08–03.09.2021, week 35) featured a more difficult epidemic situation, with the B.1.617.2 (Delta) variant circulating predominantly. Unlike the Alpha variant, it was characterized by higher transmissibility and virulence [8, 28].

The third stage of monitoring was carried out from January 24–28, 2022 (week 4), two weeks before a sharp increase in morbidity, which reached a maximum of 583.7‰ (week 6). Fortunately, this outbreak turned out to be short-lived, and after 2 weeks a rapid decline ensued. This wave of morbidity was caused by B.1.1.529 (Omicron), the circulation of which was still ongoing during the 4th stage of monitoring (10–14.10.2022, week 41).

In summarizing the data, it should be emphasized that fewer SARS-CoV-2 genetic variants were seen in the RB than in the rest of the world. Indeed, a number of variants-of-concern were not detected in the RB (B.1.351, B.1.1.28 (P.1), others), and incidence associated with circulating viral lines was relatively low. A probable reason for this phenomenon could be strong collective immunity to SARS-CoV-2, which had reached 50% (share vaccinated) near the beginning of Omicron circulation (Fig. 1). Considering that, by this time, about 11% of the population had manifested COVID-19 [11, 30], then the overall level of collective immunity could exceed 60%, even without taking into account asymptomatic infections. Thus, it is logical to assume that a threshold was reached; it was seemingly sufficient to reduce incidence to a sporadic level starting from week 20 (2022). A small one-day outbreak (within 120‰, week 28, 2022) did not change the main trend of near-zero morbidity (Fig. 1).

**Table 2. Randomization by region**

| Region | Individuals | Shareof the cohort, %(95% CI) |
|---|---|---|
| Brest Region | 621 | 13.3 (12.4–14.3) |
| Vitebsk Region | 513 | 11.0 (10.1–11.9) |
| Grodno Region | 574 | 12.3 (11.4–13.3) |
| Gomel Region | 418 | 9.0 (8.2–9.8) |
| Mogilev Region | 1043 | 22.4 (21.2–23.6) |
| Minsk Region | 578 | 12.4 (11.5–13.4) |
| Minsk | 914 | 19.6 (18.5–20.8) |
| Total | 4661 | 100 |

### Evolution of SARS-CoV-2 collective immunity among volunteers assessed by serological dynamics

*Distribution of SARS-CoV-2 seropositivity by age group.* When analyzing the evolution of humoral immunity to SARS-CoV-2, we determined Ab profiles generated in response to the circulation of two main viral antigens in the body, Nc and RBD. For this purpose, four main groups were distinguished in the volunteer cohort. The first group included individuals who did not have specific Abs circulating in their blood (anti-Nc or anti-RBD); it was designated as $Nc^-RBD^-$. The 2nd group included volunteers in whose blood Nc Abs alone were detected; it was designated as $Nc^+RBD^-$. The 3rd group included volunteers seropositive for RBD Abs alone ($RBD^+Nc^-$). The last group included volunteers with both Ab types in their blood simultaneously ($Nc^+RBD^+$). All studies were conducted in a single cohort of 4661 selected volunteers, with all volunteers participating in all monitoring stages.

In the 1st stage, a significant predominance of $Nc^+RBD^+$ over $Nc^-RBD^-$ ($p < 0.05$) was noted, mainly due to higher seropositivity among older (50–70+) individuals (Fig. 2). The smallest proportion of seropositive individuals was noted among $Nc^+RBD^-$. The share of $RBD^+Nc^-$ turned out to be approximately 4.5-fold higher than $Nc^+RBD^-$, while being significantly lower than $Nc^+RBD^+$ and $Nc^-RBD^-$ ($p < 0.05$), except for the group "18–39 years", where differences with $Nc^+RBD^+$ were not significant (Fig. 2, Table S1).

By the 2nd stage, the proportion of seronegative ($Nc^-RBD^-$) and specific seropositive groups ($Nc^+RBD^-$, $Nc^+RBD^+$) significantly decreased ($p < 0.001$). $RBD^+Nc^-$, on the contrary, increased significantly ($p < 0.0001$) (Fig. 2, Table S1). A reason for these changes is likely expansion of vaccination coverage, which by this time amounted to more

than 15%. The most widely used preparation during this period was Sputnik V (vector vaccine) whose mechanism leads to production of RBD antigen alone. By the 3rd stage, a change in trend was noted, manifested by a noticeable increase in the share of $Nc^+RBD^+$, alongside steep decreases in $Nc^-RBD^-$ and $Nc^+RBD^-$ ($p < 0.0001$), as well as an insignificant decrease in $RBD^+Nc^-$ (Fig. 2, Table S1). By this time, vaccination coverage was 47% (Fig. 1).

The situation that developed by the 4th stage was characterized by an absolute dominance of $Nc^+RBD^+$ status (Fig. 2, Table S1). Taking into account the short-term outbreak of COVID-19 in the 6th week of 2022, as well as the high level of vaccination (which amounted to 70.2% by the 4th stage), it can be assumed that these factors contributed to the formation of a high level of $Nc^+RBD^+$ dominant positivity. It averaged 80.0% for the cohort (95% CI: 78.8–91.2), likely becoming one of the reasons for the near-zero COVID-19 morbidity in the Belarusian population starting from week 20 of 2022 (Fig. 1).

*Features of collective immunity formation in different Belarusian regions.* The Republic of Belarus is a relatively compact nation, located on the hilly plain of Eastern Europe, with a temperate continental climate and favorable environmental conditions. In general, these conditions are typical for all of the Republic's regional administrative entities. As such, there were no preliminary grounds to expect significant regional differences in the development of the COVID-19 epidemic process. Our preliminary assumptions, and the results of a cross-sectional randomized study [30], were in good agreement with each other.

In the 1st stage, there was a significant predominance of $Nc^+RBD^+$ and $Nc^-RBD^-$ status compared with $Nc^+RBD^-$ ($p < 0.0001$) and $RBD^+Nc^-$ ($p < 0.001$) (Fig. 3, Table S2).

By the 2nd stage, the structure of seropositivity had changed significantly. The $RBD^+Nc^-$ subpopulation became dominant, and the share of $Nc^+RBD^+$ was lower. These differences, however, only reached significance in Vitebsk oblast, Minsk oblast, and the capital Minsk ($p < 0.05$). The share of $Nc^-RBD^-$ decreased significantly relative to $RBD^+Nc^-$ in all regions ($p < 0.001$). The share of $Nc^+RBD^-$ turned out to be 6 to 10-fold lower than other subpopulations (Fig. 3, Table S2).

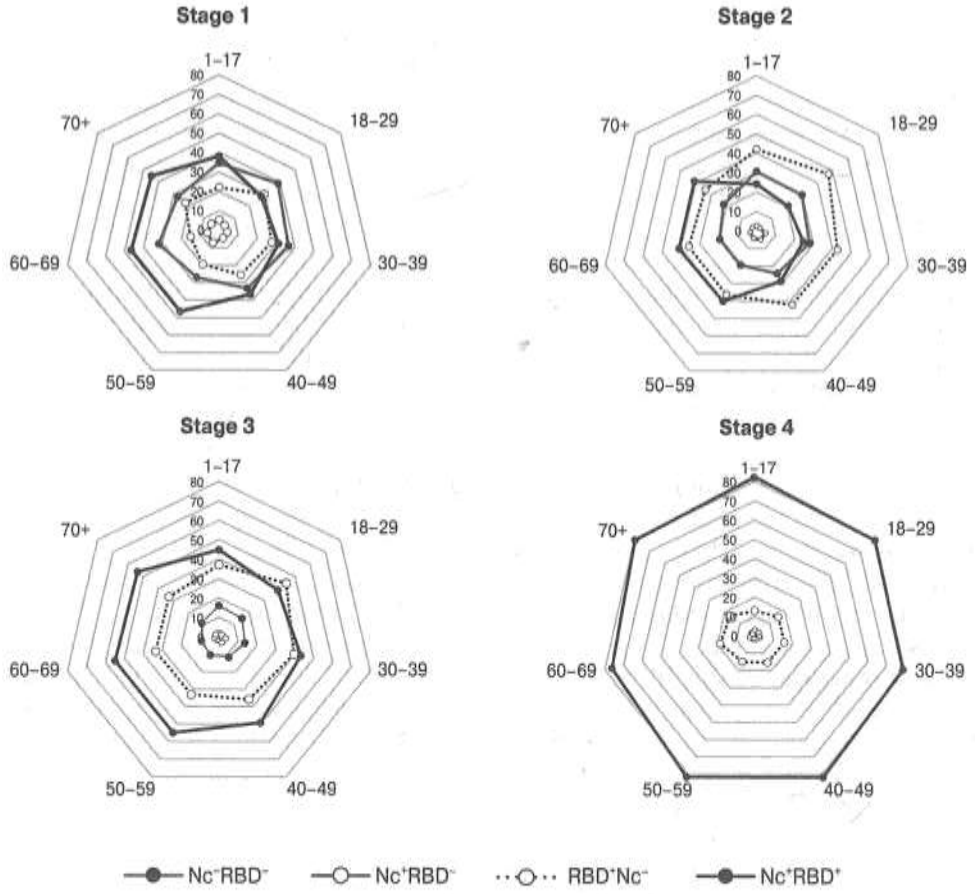


**Figure 2. Distribution of seropositivity (Nc, RBD) among volunteers by age group and seromonitoring stage**
**Note.** $Nc^-RBD^-$ — SARS-CoV-2 Ab seronegative individuals; $Nc^+RBD^-$ — those seropositive for Nc Abs only; $RBD^+Nc^-$ — those seropositive for RBD Abs only; $Nc^+RBD^+$ — those seropositive for both Abs. Vertical value axis: share of the age subgroup with the indicated serological status, %. Sectors: age intervals, years. Numerical values for the graphs are given in Supp. Table S1. Monitoring stage is indicated above the diagrams.

The structure of volunteer subpopulations in terms of seropositivity in stages 3 and 4 was identical to that obtained when analyzing the data by age (Fig. 2, Table S1). The share $Nc^+RBD^+$ increased from stage to stage. By the end of the study (stage 4), it reached a maximum, varying from 78.0% (95% CI: 73.7–81.9) in the Gomel region to 83.0% (95% CI: 80.4–85.4) in Minsk. The share of $RBD^+Nc^-$ in the whole cohort, on the contrary, decreased from 36.0% (95% CI: 34.6–37.4) at the 3rd stage to 15.8% (95% CI: 14.7–16.8) at the 4th stage ($p < 0.0001$). The shares of $Nc^-RBD^-$ and $Nc^+RBD^-$ decreased from stage to stage, dropping to 2.1% by the end of monitoring (Fig. 3, Table S2).

Thus, the dynamics of SARS-CoV-2 collective immunity among the populations of different administrative regions in the RB turned out to be generally the same: a prevailing trend featuring an increasing in the share of $Nc^+RBD^+$; associated breaks in viral transmission; followed by the near cessation of COVID-19 epidemic incidence, at least in terms of manifest forms of infection.

*Influence of occupational factors on the structure of SARS-CoV-2 antibody seroprevalence.* Occupation can have a significant impact on seroprevalence level and structure. There is an extensive list of professions that involve constant wide contact with the surrounding population. Visual, and often tactile, contacts with people are typical for certain professional categories, such as healthcare, education, trade, transport, catering, consumer services (hair salons, massage parlors, spas, etc.), as well as among a number of other people who cannot carry out their work duties remotely or in self-isolation mode. As such, it follows that SARS-CoV-2 Ab seroprevalence among individuals in such professions can have a significant impact on the course and outcome of the COVID-19 epidemic process. Analysis of seropositivity levels, taking into account the professional structure of the surveyed cohort, was the next step in monitoring assessment (Fig. 4, Table S3).

In the 1st stage, a noticeable spread in the shares of $Nc^-RBD^-$, $RBD^+Nc^-$ and $Nc^+RBD^+$ was observed (Fig. 4). When calculating the variance, the largest value was noted in $Nc^-RBD^-$ (81.86); the smallest was in $RBD^+Nc^-$ (35.64). The share of $Nc^+RBD^-$ was only 5.4% (95% CI: 5.1–6.1); the dispersion was 4.18. The largest proportion of $Nc^-RBD^-$ was observed among children (58.8%; 95% CI: 44.2–72.4). In the $Nc^+RBD^+$ group, the maximum proportions were found

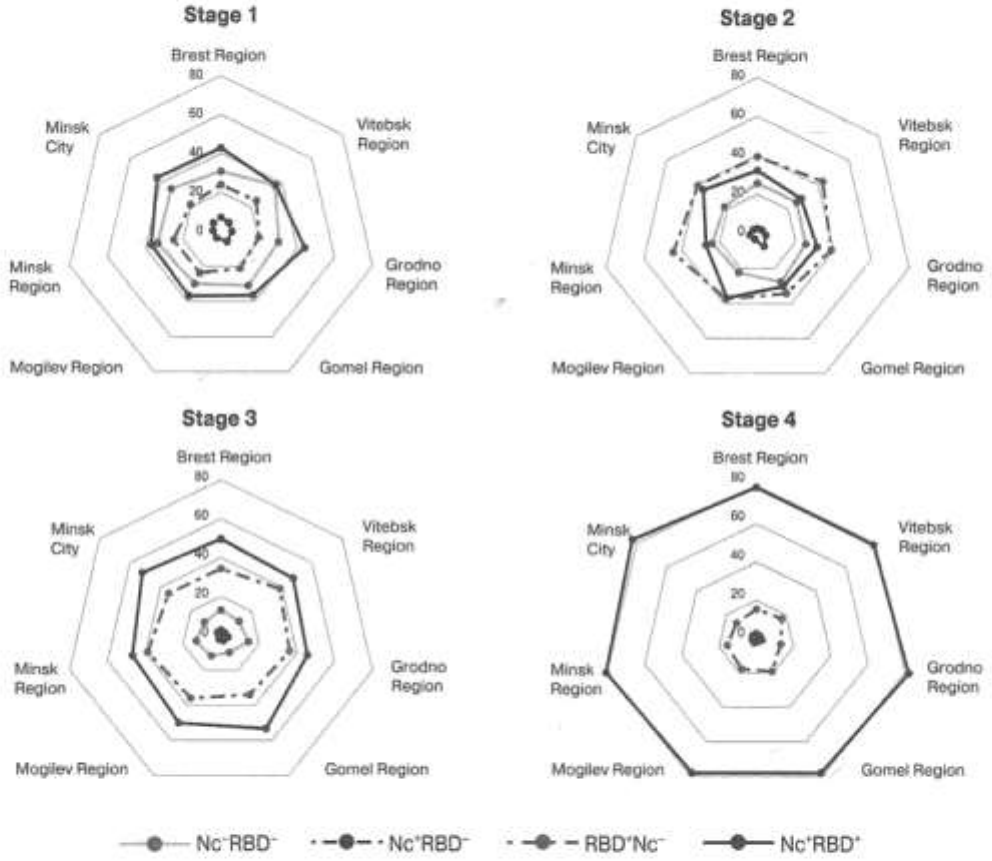


**Figure 3. Distribution of volunteer seropositivity (Nc, RBD) by region and seromonitoring stage**
**Note.** $Nc^-RBD^-$ — SARS-CoV-2 Ab seronegative individuals; $Nc^+RBD^-$ — those seropositive for Nc Abs only; $RBD^+Nc^-$ — those seropositive for RBD Abs only; $Nc^+RBD^+$ — those seropositive for both Abs. Vertical value axis: share of residents with the indicated serological status, %. Sectors: age intervals, years. Numerical values for graphs are given in Suppl. Table S2. Monitoring stage is indicated above the diagrams.

among military personnel (56.7%; 95% CI: 37.4–74.5) and civil servants (53.3%; 95% CI 44.1–62.2) (Table S3).

Stage 2 was characterized by an increase in the proportion of $RBD^+Nc^-$ in almost all population groups: from 22.7% (95% CI: 21.6–24.0) in stage 1 to 39.5% (95% CI: 38.1–40.9); differences were significant at $p < 0.0001$ (Fig. 4, Table S3). The shares of all other categories, on the contrary, decreased: $Nc^-RBD^-$ by 1.3-fold; $Nc^+RBD^-$ by 1.5-fold; and $Nc^+RBD^+$ by 1.2-fold. The differences were significant ($p < 0.05$).

The general trend of changes in the structure of immunity in later stages was noted in all population groups, regardless of the field of activity. By the 3rd stage, the structure of seropositivity had noticeably changed. The share of $Nc^+RBD^+$ increased to 49.5% (95% CI: 48.0–50.4) compared to 32.7% (95% CI: 31.3–34.0) in the 2nd stage; the differences were significant ($p < 0.001$). A pronounced decrease (almost 2-fold) to 12.1% (95% CI: 11.2–13.1) was noted for $Nc^-RBD^-$. The $RBD^+Nc^-$ value decreased by an average of 3.5% for the cohort to 36.0% (95% CI: 34.6–37.4). The differences with 2nd stage data were significant ($p < 0.05$).

In the 4th stage, the trend towards the formation of stable collective immunity reached its maximum strength, manifested in all population groups as a significant increase in the proportion of $Nc^+RBD^+$. It ranged from 74.3% (95% CI: 56.7–87.5) in the group "scientists" to 87.0% (95% CI: 73.7–95.1) in the group "students". In result, the proportions of $Nc^-RBD^-$ and $Nc^+RBD$- in each population group decreased to 2–3% (Fig. 4, Table S3).

In summarizing the obtained data, we can formulate the main trend regarding collective immunity. Active immunization, carried out across the 4-stage seromonitoring period, was accompanied by the accumulation of SARS-CoV-2 specific Abs, and these likely became the leading factor in reducing pathogen circulation. COVID-19 incidence and spread were nearly stopped, at least in terms of symptomatic infections.

*Quantitative distribution of Nc Abs during seromonitoring.* Assessment of general seroprevalence is convenient and informative, but it does not represent fine data on the quantitative distribution of Nc or RBD antibodies. To quantitatively measure the levels

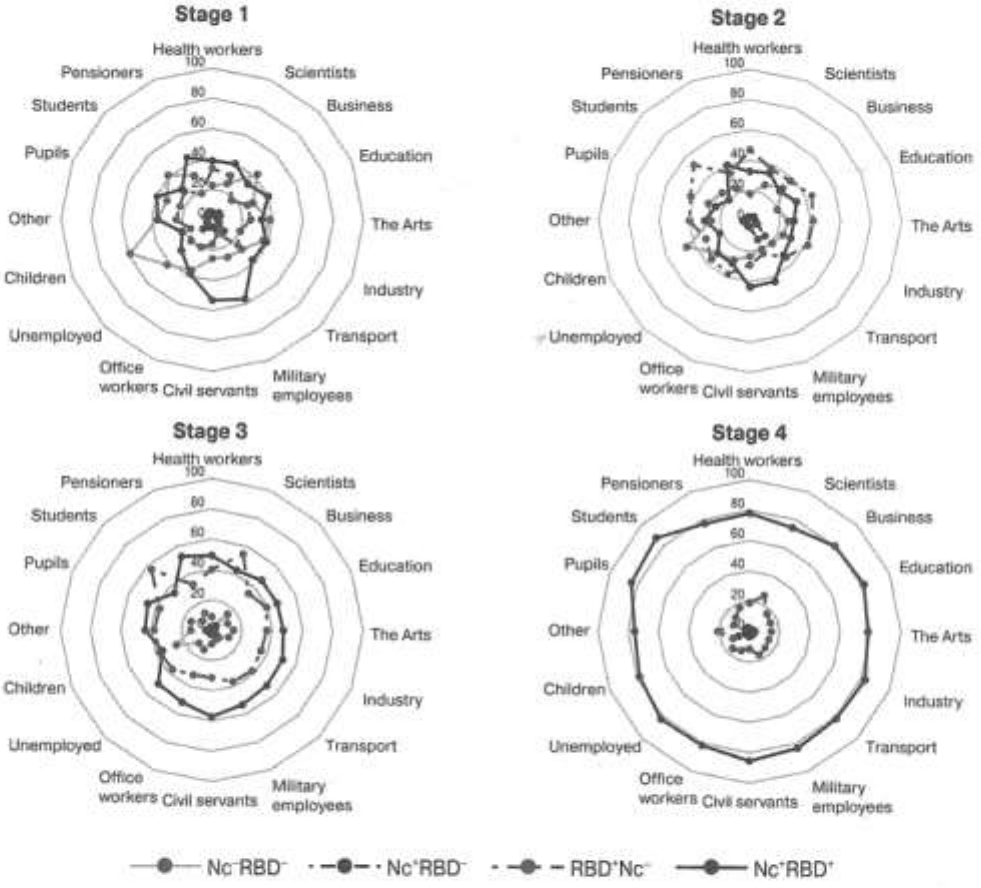


**Figure 4. Distribution of volunteer seropositivity (Nc, RBD) by professional group and seromonitoring stage**

**Note.** $Nc^-RBD^-$ — SARS-CoV-2 Ab seronegative individuals; $Nc^+RBD^-$ — those seropositive for Nc Abs only; $RBD^+Nc^-$ — those seropositive for RBD Abs only; $Nc^+RBD^+$ — those seropositive for both Abs. Vertical value axis: share of occupational group with the indicated serological status, %. Sectors: age intervals, years. Numerical values for the graphs are given in Supp. Table S3. Monitoring stage is indicated above the diagrams.

of circulating Abs in volunteers at each stage of seromonitoring, an appropriate test system was used, as described in a previous work [30]. When assessing the distribution of Nc Ab levels in volunteers of all age groups, the predominance of low Ab levels (31.3–125.6 BAU/ml) attracts attention (Fig. 5, Table S4).

In the 1st stage, the share of such individuals was 21.3% (95% CI: 20.1–22.5), which was 2.2 to 8.4-fold higher than the proportion of volunteers with other Nc Ab levels (Fig. 5, Table S4). The distribution of Nc Ab levels in age groups turned out to be relatively homogeneous, with minor exceptions: a slight predominance of individuals with very low levels (16.8–31.2 BAU/ml) in the children's group; and a somewhat higher share of those with Ab levels of 31.3–125.6 BAU/ml in the group "50–59 years old". Differences in both groups, relative to the cohort mean, were significant ($p < 0.05$).

In the 2nd stage, the share of individuals with an Ab level of 31.3–125.6 BAU/ml decreased to an average of 17.5% (95% CI: 16.4–18.6); differences from 1st stage data were significant ($p < 0.05$). The decrease was due to an almost two-fold decrease in the proportion of such persons among children and adults aged 18–29 years (Fig. 5, Table S4); the differences were significant ($p < 0.0001$).

In the 3rd stage, antibody distributions almost returned to stage 1 levels. A four-fold increase was noted only among individuals with an Ab level > 502.5 BAU/ml (Table S4).

In the 4th stage, significant increases in the shares of seropositive volunteers were observed at all quantitative levels, with the exception of the interval 16.8–31.2 BAU/ml. In the subgroup 31.3–125.6 BAU/ml, the share of volunteers increased by 1.5-fold ($p < 0.0001$). In the subgroup 125.8–251.2 BAU/ml, the increase was 2.1-fold ($p < 0.0001$). In the subgroup 251.4–502.5 BAU/ml, the increase was 2.0-fold ($p < 0.001$). In the subgroup with maximum Ab levels (> 502.5 BAU/ml), the increase was 1.9-fold ($p < 0.001$). It can be assumed that the noted growth was associated with an increase in the proportion of $Nc^+RBD^+$ volunteers at this stage, which can be clearly seen in Figure 2 (Stage 4).

Since it has been shown that neutralizing activity against SARS-CoV-2 is more associated with

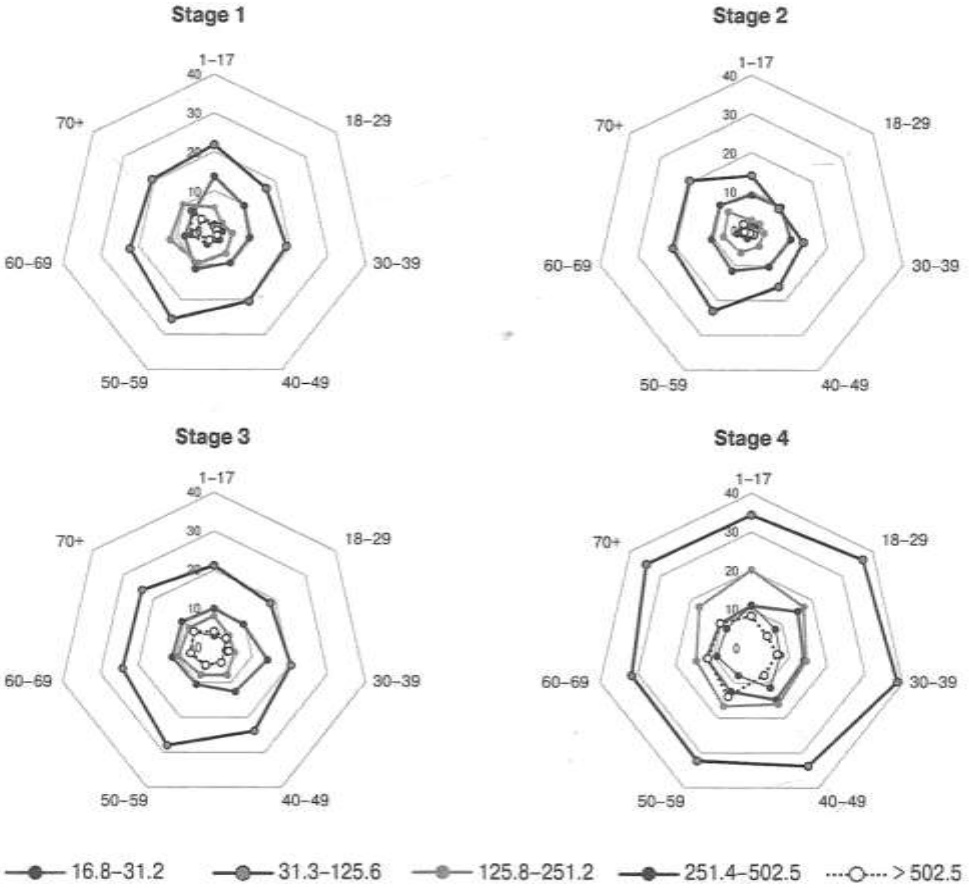


**Figure 5. Distribution of Nc Ab levels by volunteer age group and seromonitoring stage**
**Note.** The vertical value axis is percentage of all seropositive individuals (normalized to 100%) in the age subgroup with the indicated serological status, %. Sectors: volunteer age intervals, years. Legend: Nc Ab quantitative levels in BAU/ml. The numerical values are given in Supp. Table S4. Monitoring stage is indicated above the diagrams.

RBD Abs [34], these levels were also assessed (Fig. 6, Table S5). In the 1st monitoring stage, the largest proportion of seropositive volunteers carried RBD Abs at the 22.6–220.0 BAU/ml level (Fig. 6). The largest share of such persons was noted in the group aged 1–17 years (44.6%; 95% CI: 40.4–48.8). The smallest was noted in the group aged 60–69 years (26.4%; 95% CI: 23.2–29.8). The differences were significant ($p < 0.001$).

In the 2nd stage, significant changes were not noted. The shares of individuals with minimum (22.6–220 BAU/ml) and maximum (> 450 BAU/ml) levels increased by an average of 4.4% (differences from stage 1 were significant, $p < 0.05$). In the group with Abs in the range 221–450 BAU/ml, there were practically no changes compared with the 1st stage (Fig. 6, Table S5).

By the 3rd stage, an increase in the proportion of volunteers with high RBD Ab levels was noted. The share of volunteers with Ab levels of 221–450 BAU/ml increased by 5.4% to 16.9% (95% CI: 15.8–18.1); differences from 2nd stage data were significant ($p < 0.001$). In the subgroup with Abs > 450 BAU/ml, the increase was 10%, reaching 30.0% (95% CI: 28.7–31.4); differences from stage 2 were significant ($p < 0.0001$).

By the 4th stage, the proportion of individuals with an Ab level of 221–450 BAU/ml increased by another 4.7% to 21.6% (95% CI: 20.4–22.8). In the subgroup with Ab levels of > 450 BAU/ml, it reached a maximum of 51.0% (95% CI: 49.6–52.4). The differences were significant ($p < 0.00001$).

Thus, the evolution of collective humoral immunity across the stages of seromonitoring was manifested by a significant increase in the proportion of seropositive volunteers with maximum RBD Ab levels and, to a lesser extent, anti-Nc Ab levels. One likely driving factor in this process could be the vaccination pattern in the Belarusian population.

*Structure of volunteer SARS-CoV-2 vaccination during the monitoring period.* By the 18th week of 2021 (before commencement of this study), the COVID-19 pandemic had already lasted 15 months and passed at least 2 main waves. Ten weeks before the start of seromonitoring, vaccination began in the RB. Coverage by week 18 reached 2.1% of the Belarusian population

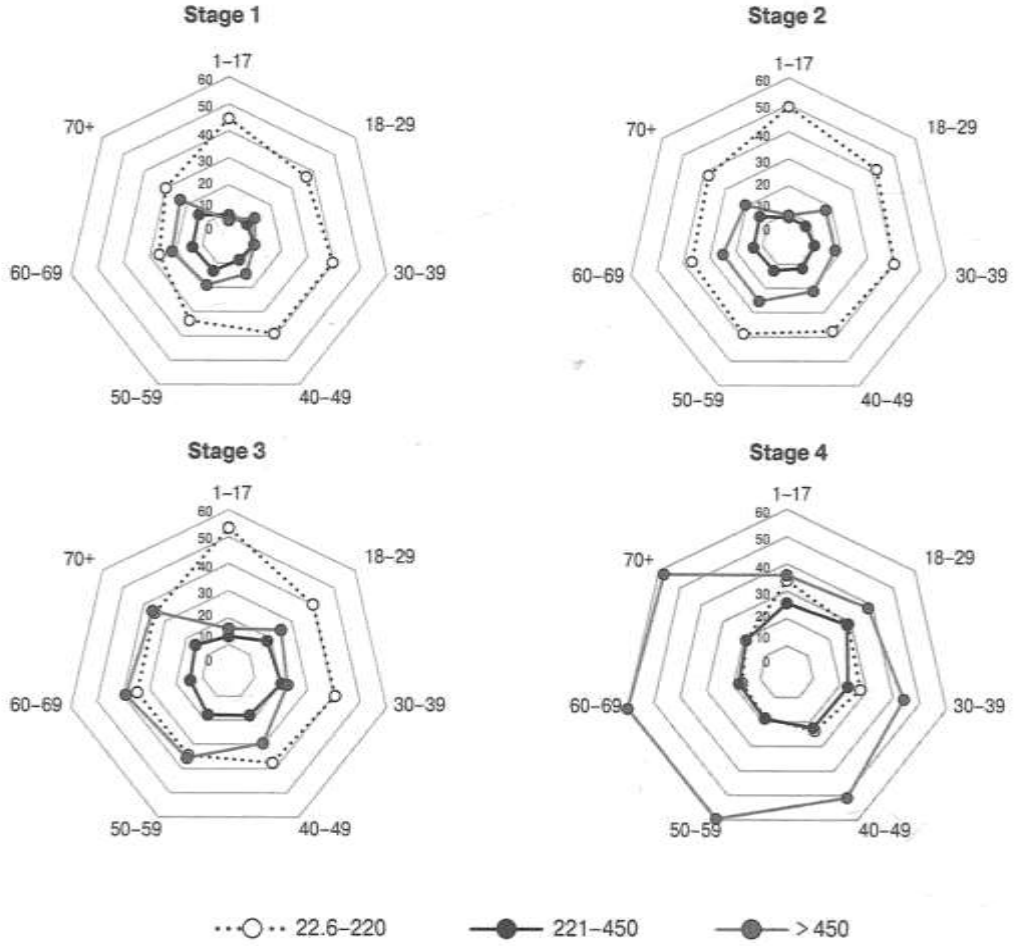


**Figure 6. Distribution of RBD Ab levels by volunteer age group and seromonitoring stage**
**Note.** The vertical value axis is percentage of all seropositive individuals (normalized to 100%) in the age subgroup with the indicated serological status, %. Sectors: volunteer age intervals, years. RBD Ab quantitative levels in BAU/ml. Quantitative data are given in Supp. Table S5. Monitoring stage is indicated above the diagrams.

(Fig. 1). In the initial period, the Sputnik V (Gam-COVID-Vac) vector vaccine was mainly used in the country; its share was 89.2%.

Some volunteers could not name the type of vaccine received. The data for these individuals were grouped separately and designated as "Other" (Fig. 7). There were 10.8% of such individuals in the 1st stage of the study. Such uncertainties were no longer observed in subsequent monitoring stages.

In the 2nd monitoring stage, the structure of vaccine usage changed somewhat: the share of Sputnik V decreased by 3.9%; but at the same time, the BBIBP-CorV whole-virion vaccine was added, the share of which was 14.7%.

In stage 3, the range of vaccines expanded as much as possible. At the same time, the share of Sputnik V decreased to 32.8%, and the share of BBIBP-CorV increased to 33.4%. In addition, the Sputnik Light vector vaccine (32.1%), and four preparations in minor quantities (EpiVacCorona, CoviVac and Sinovac-CoronaVac) were added. The total share of the latter group was only 1.6%.

By the last stage, the range of the main vaccines used was preserved; only their proportions changed. The share of Sputnik V decreased to 15.1%, the share of Sputnik Light increased, and BBIBP-CorV decreased by 11% to 22.4%.

Changes in the list of vaccines used in the 3rd and 4th stages can be explained to some extent by the booster re-vaccination campaign, in which Sputnik Light was most often used. The campaign started on weeks 39–40 of 2021. By the 4th stage, re-vaccination coverage amounted to almost 40% of the total number of people who had fully completed immunization. In this regard, it can be reasonably argued that the most important consequence of the implementation of the primary immunization and booster revaccination programs was a sharp decrease in the number of illnesses to nearly zero starting from the 19th week of 2022. The short-term surge in infections noted on the 27th week (2022) was an isolated event that did not affect the general trend of the epidemic process.

## Discussion

The COVID-19 epidemic in the Republic of Belarus was milder than in neighboring countries. According to official data for the entire pandemic period, almost 990 000 people fell ill in the country. According to this indicator, Belarus ranks 75th in the world [11]. Such low morbidity is probably due not only to relatively low population density (45.5 km$^2$), but also to active vaccination, which by mid-October 2022 amounted to 70.2% of the population. This was accompanied by a set of other measures to prevent the spread of COVID-19 in the Republic [17].

As in other countries, SARS-CoV-2 during the epidemic period in the RB has undergone specific evolution associated with antigenic variability of the virus (Fig. 1). The beginning of the epidemic, like the rest of the world, was due to circulation of the ancestral (Wuhan) viral strain, which became the source of almost instantaneous infection of people globally. In the RB, the first cases of infection were detected in the 15th week of 2020. The strain disappeared from circulation by about week 30 of 2020 and was replaced by the first mutated strain, B.1.1.7 (Alpha). In weeks 24–25 of 2021, the B.1.612.2 (Delta) variant forced out Alpha from circulation, and from the 1st week of 2022 it was replaced by line B.1.1.629 (Omicron). In fairness, it should be noted that successive viral variants did not cause massive morbidity. For the most part, COVID-19 morbidity did not exceed 100–170 cases per 100 000 population.

One of the reasons for this situation could be collective humoral immunity formed after COVID-19 illness. The first stage of the study (assessing the state of collective humoral immunity) was carried out from May 14–19, 2021. By this time, the COVID-19 pandemic had already lasted for 17 months, and about 380 000 people had experienced symptomatic illness (about 4.7% of the total population). To this should be added about 45% of the population who had experienced asymptomatic infection [30]. In total, at least 50% could have had an immune response to either Nc or RBD antigen, or both.

The results of serological testing of the population for the presence of SARS-CoV-2 Abs in the 1st monitoring stage generally confirmed this hypothesis. When assessing total seroprevalence in the entire

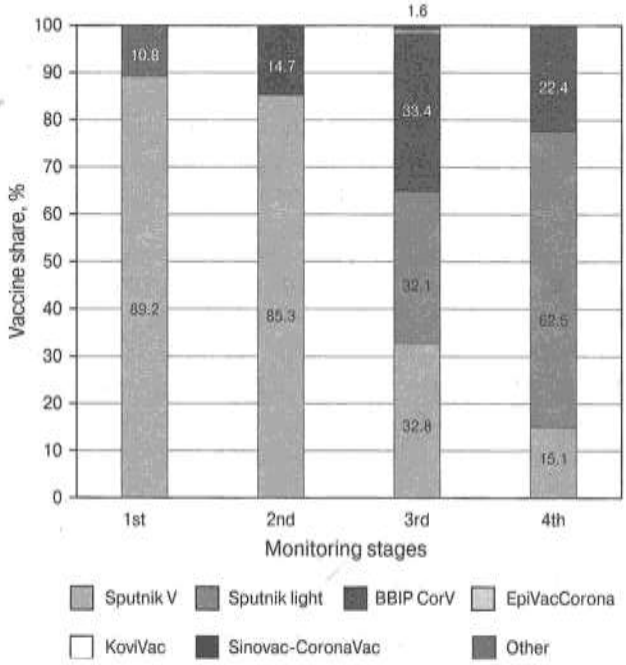


**Figure 7. Vaccine usage structure in the Republic of Belarus during the seromonitoring period**

**Note.** Other — volunteers were unable to specify the vaccine type received. The number 1.6 at the top of column 3 is the total share of EpiVacCorona, CoviVac and Sinovac-CoronaVac vaccines.

age-stratified cohort, the proportion of individuals who had any specific Abs (to Nc, RBD, or both) was 67.8% (95% CI: 66.5–69.2). The majority of volunteers were seropositive for both Ags ($Nc^+RBD^+$). In terms of age, the highest seropositivity was seen among those aged 50–70+; the lowest was seen in those aged 18–29 years (Table S1). It can be assumed that the higher level of seropositivity in older volunteers (about 70.0%) is due to the presence of pre-existing cross-immunity elicited as a result of anamnestic contact with endemic strains of coronaviruses [16]. As for the low seropositivity in the age group of 18–29 years, 61.3% (95% CI: 56.4–66.1), a certain proportion of them were students, among whom up to 40%, according to some data, are skeptical about the idea of vaccination against SARS-CoV-2 [6, 21, 35]. This was probably an additional reason why more than a third of volunteers of this age did not have specific Abs (Table S1).

As the COVID-19 vaccination campaign expanded, the pattern of circulating Abs changed markedly. The proportion of seronegative volunteers ($Nc^-RBD^-$) decreased from 32.2% (95% CI: 30.8–33.5) to 24.2% (95% CI: 23.0–25.4). The shares of other subpopulations varied in different directions: $Nc^+RBD^-$ decreased by 1.5-fold to 3.7% (95% CI: 3.2–4.2); $Nc^+RBD^+$ decreased by 1.2-fold to 32.7 (95% CI: 31.3–34.0); while $RBD^+Nc^-$, on the contrary, increased 1.7-fold and amounted to 39.5% (95% CI: 38.1–40.9). Distribution by age interval was relatively uniform. Significant increases were noted in the $RBD^+Nc^-$ subgroup among people aged 18–29, as well as in the $Nc^+RBD^+$ subgroup among older volunteers aged 50 to 70+ ($p < 0.05$ in both cases).

As vaccination coverage increased, there was a trend towards an increase in RBD positivity in the Belarusian population. By stage 3, in particular, the share of $Nc^+RBD^+$ individuals increased by 1.5-fold to 49.5% (95% CI: 48.0–50.9). The growth in fully seropositive individuals was accompanied by a slight decrease in the share of $RBD^+Nc^-$ by 3.5% and a decrease in $Nc^-RBD^-$ by 2-fold.

The outlined trend reached its greatest expression by the 4th stage. The share $Nc^+RBD^+$ increased to 80.0% (95% CI: 78.8–91.2), while $RBD^+Nc^-$ and $Nc^-RBD^-$ decreased by 2.3 and 5.8-fold, respectively (Table S1). The described processes were noted during stratification by age, region, and occupational group (Fig. 2–4, Tables S1–S3). Some minor group differences were seen leading to some heterogeneity, yet the overall evolution of collective immunity was not affected in any substantial way by subgroup differences.

Assessment of collective immunity would not be complete without a quantitative analysis of peripheral blood Ab content. As part of this study, the quantitative content of circulating anti-Nc and anti-RBD Abs was assessed (Fig. 5, 6; Tables S4, S5). The 1st stage survey showed a predominance of individuals with Nc Ab content within the range 31.5–125.5 BAU/ml in the cohort. The share of such volunteers in the whole group was 21.3% (95% CI: 20.1–22.5); differences between cohort age groups were not significant. In the 2nd stage, a significant decrease in the proportion of individuals with such Abs (31.5–125.5 BAU/ml) down to 17.5% (95% CI: 16.4–18.6) was revealed ($p < 0.0001$). In the remaining groups, a weak growth in the number of individuals was noted for all Nc Ab levels (Fig. 5, Table S4). In the 3rd and 4th stages, due to the general increase in Nc Ab seroprevalence in the population, the number of volunteers with Nc Abs increased evenly in all serological intervals.

The distribution patterns of seropositive volunteers by RBD Ab level generally mirrored Nc Ab distributions, with the exception of certain features (Fig. 6, Table S5). In the first two stages of seromonitoring (carried out an interval of 4 months), individuals with RBD Ab levels of 22.6–220 BAU/ml prevailed in all age groups. This was especially pronounced among children, where their proportions were 44.6% (95% CI: 40.4–48.8) and 49.3% (95% CI: 45.0–53.7), respectively. Starting from stage 3, the proportion of people with maximum RBD Ab levels (> 450 BAU/ml) increased significantly. By stage 4, it reached an average of 51.0% (95% CI: 49.6–52.4). In those older than 40 years, it ranged from 51.0 to 59.9%. In all cases, the differences were significant ($p < 0.0001$).

Overall, the described seropositivity dynamics clearly indicate the evolution of collective humoral immunity towards the formation of a full response following not only to infection (cumulative incidence), but also the use of specific SARS-CoV-2 vaccines. In result, these processes led to the simultaneous circulation of Nc and RBD Abs, with a predominance of anti-RBD Abs. A likely prerequisite for this could be the predominant use of vector vaccines, in particular Sputnik V, during primary vaccination (stages 1, 2) and booster vaccination (stages 3, 4). At the same time, the total share of both Sputnik vaccines in the overall structure varied from 89.2% in the 1st stage to 77.6% in the 4th (Fig. 7).

Taking into account the previously noted effectiveness of vector vaccines [41], the widespread use of the Sputnik family of vaccines may have become a significant factor behind decreasing COVID-19 incidence in the population. Another pattern confirming such a process is the inverse relationship between population humoral immunity and morbidity: an increase in post-vaccination resistance is inevitably accompanied by a decrease in morbidity [10, 18, 26, 27, 30, 36].

The combined increase in the content of the two main antibody types indicates the formation of hybrid immunity [15], usually featuring maximum protection against the "aggression" of a pathogenic agent [41]. The use of a range of specific vaccines made it possible to create the required level of COVID-19 resistance in the population (Fig. 7).

In the initial period, the Gam-COVID-Vac vector vaccine (Sputnik V) was mainly used, which made

it possible to form a stable pool of RBD Abs, which laid the foundation for the formation of hybrid immunity. In the 2nd stage, usage of vector vaccines remained almost at the initial level. In the 3rd stage, usage ratios were: almost $^2/_3$ vector vaccines and $^1/_3$ inactivated vaccine (BBIBP-CorV). In the 4th stage, the spectrum of vaccines was preserved, but the ratio changed due to expanded usage of the Sputnik Light vaccine.

## Conclusion

Consistent use of vector vaccines that do not contain Nc antigens was sufficient to form a maximal level of post-vaccination immunity. The additional introduction of the whole-virion inactivated BBIBP-CorV vaccine into the practice of vaccination served as a prerequisite for maximal growth of hybrid immunity and, ultimately, the near-complete elimination of new COVID-19 cases. Based on the data obtained, we can formulate a key requirement in the formation of robust coronavirus immunity: maximum vaccination coverage using a wide range of vaccines, with both vector and inactivated whole-virion platforms present. This approach, combined with anamnestic morbidity, makes it possible to form the most durable adaptive immunity.

## Supplementary materials

Table S1. Shares of seropositive and seronegative individuals by age and seromonitoring stage; Table S2. Shares of seropositive and seronegative individuals by region and seromonitoring stage; Table S3. Shares of seropositive and seronegative individuals by professional category; Table S4. Distributions by volunteer Nc Ab level and age; Table S5. Distributions by volunteer RBD Ab level and age. Tables are available at: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-EOH-14440.

## Declarations

**Author contributions.** AYP, AAT — conceptualization; AMD; AMM; AAT — data curation; VAI, SAE, VSS — formal analysis; IVD, ING, AVG, VGD, OBZ. OAP, APR — investigation; EVZ — methodology TAA, AMD — project administration; ALS; LVR; EOS — resources; AMM, SAE, TVA — supervision; IAK, NPS — validation; VSS, ESR — writing — original draft; VSS; TAA. SAE — writing — review & editing

**Funding.** This research received no external funding.

**Conflict of interest.** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose. The authors have no competing interests to declare relevant to the content of this article.

**Ethics approval.** The study was organized in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committees of the Republic of Belarus (protocol No 2, dated 05.13.2021) and the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 64, dated 26.05.2020).

**Consent to publication.** Not applicable.

## References

1. 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*
2. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Петленко С.В. Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ. СПб.: Гиппократ, 2020. 336 с. [Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Petlenko S.V. Biology of pathogens and control of influenza and acute respiratory viral infection. *St. Petersburg: Hippocrates, 2020. 336 c. (In Russ.)*]
3. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 221–246. [Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Akimkin V.G., Maleev V.V. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 221–246. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-HOI-1412*
4. Adegboye O., Saffary T., Adegboye M., Elfaki F. Individual and network characteristics associated with hospital-acquired Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *J. Infect. Public Health., 2019, vol. 12, pp. 343–349. doi: 10.1016/j.jiph.2018.12.002*
5. Agresti A., Coull B.A. Approximate is better than "exact" for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician, 1998, vol. 52, no. 2, pp. 119–126. doi: 10.2307/2685469*
6. Bolatov A.K., Seisembekov T.Z., Askarova A.Zh., Pavalkis D. Barriers to COVID-19 vaccination among medical students in Kazakhstan: development, validation, and use of a new COVID-19 vaccine hesitancy scale. *Hum. Vaccin. Immunother., 2021, vol. 17, no. 12, pp. 4982–4992. doi: 10.1080/21645515.2021.1982280*
7. Buss L.F., Sabino E.C. Intense SARS-CoV-2 transmission among affluent Manaus residents preceded the second wave of the epidemic in Brazil. *Lancet Glob. Health, 2021, vol. 9, no. 11, pp. e1475–e1476. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00396-X*
8. Butt A.A., Dargham S.R., Chemaitelly H., Al Khal A., Tang P., Hasan M.R., Coyle P.V., Thomas A.G., Borham A.M., Concepcion E.G., Kaleeckal A.H., Latif A.N., Bertollini R., Abou-Samra A.B., Abu-Raddad L.J. Severity of illness in persons infected with the SARS-CoV-2 delta variant vs beta variant in Qatar. *JAMA Intern. Med., 2022, vol. 182, no. 2, pp. 197–205. doi: 10.1001/jamainternmed.2021.7949*
9. Chen T., Zhou M., Dong X., Qu. J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia, J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7*

10. Chen Y.T. The effect of vaccination rates on the infection of COVID-19 under the vaccination rate below the herd immunity threshold. *Int. J. Environ. Res. Public Health, 2021, vol. 18, no. 14: 7491. doi: 10.3390/ijerph18147491*
11. Coronavirus statistics in the world. *URL: https://gogov.ru/covid-19/world (25.12.2022)*
12. Coronavirus-monitor. *URL: https://coronavirus-monitor.info (25.12.2022)*
13. Countrymeters. *URL: https://countrymeters.info/ru (12.12.2022)*
14. COVID-19 data repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. *URL: https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19 (23.12.2022)*
15. Crotty S. Hybrid immunity: COVID-19 vaccine responses provide insights into how the immune system perceives threats. *Science, 2021, vol. 372, no. 6549, pp. 1392–1393. doi: 10.1126/science.abj2258*
16. Crowley A.R., NatarajanH., Hederman A.P., Bobak C.A., Weiner J.A., Wieland-Alter W., Lee J., Bloch M., Tobian A.A.R., Redd A.D., Blankson J.N., Wolf D., Goetghebuer T., Marchant A., Connor R.I., Wright P.F., Ackerman M.E. Boosting of cross-reactive antibodies to endemic coronaviruses by SARS-CoV-2 infection but not vaccination with stabilized spike. *Elife, 2022, vol. 11: e75228. doi: 10.7554/eLife.75228*
17. Dashkevich A.M., Kolomiets N.D., Glinskaya I.N., Skuranovich A.L., Tarasenko A.A., Karaban I.A. COVID-19 pandemic. Measures to prevent the spread in the Republic of Belarus. *Issues of Organization and Informatization of Healthcare, 2022, vol. 2, pp. 4–11.*
18. Datta S., Roy A. Herd immunity against coronavirus: a review. *Recent Pat. Biotechnol., 2022, vol. 16, pp. 3256–3265. doi: 10.2174/1872208316666220408113002*
19. Dubey A., Choudhary S., Kumar P., Tomar S. Emerging SARS-CoV-2 variants: genetic variability and clinical implications. *Curr. Microbiol., 2021, vol. 79, no. 1: 20. doi: 10.1007/s00284-021-02724-1*
20. Farahat R.A., Abdelaal A., Umar T.P., El-Sakka A.A., Benmelouka A.Y., Albakri K., Ali I., Al-Ahdal T., Abdelazeem B., Sah R., Rodriguez-Morales A.J. The emergence of SARS-CoV-2 Omicron subvariants: current situation and future trends. *Infez. Med., 2022, vol. 30, no. 4, pp. 480–494. doi: 10.53854/liim-3004-2*
21. Getachew D., Yosef T., Solomon N., Tesfaye M., Bekele E. Predictors of unwillingness to receive COVID -19 vaccines among Ethiopian Medical students. *PLoS One, 2022, vol. 17, no. 11: e0276857. doi: 10.1371/journal.pone.0276857*
22. Gómez C.E., Perdiguero B., Esteban M. Emerging SARS-CoV-2 variants and impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 9, no. 3: 243. doi: 10.3390/vaccines9030243*
23. Han J., Yin, J., Wu, X., Wang D., Li C. Environment and COVID-19 incidence: a critical review. *Review J. Environ. Sci. (China), 2023, vol. 124, pp. 933–951. doi: 10.1016/j.jes.2022.02.016*
24. Khandia R., Singhal S., Alqahtani T., Kamal M.A., El-Shall N.A., Nainu F., Desingu P.A., Dhama K. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant, salient features, high global health concerns and strategies to counter it amid ongoing COVID-19 pandemic. *Environ. Res., 2022, vol. 209: 112816. doi: 10.1016/j.envres.2022.112816*
25. Lubinski B., Fernandes M.H.V., Frazier L., Tang T., Daniel S., Diel D.G., Jaimes J.A., Whittaker G.R. Functional evaluation of the P681H mutation on the proteolytic activation of the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 (Alpha) spike. *iScience, 2022, vol. 25, no. 1: 103589. doi: 10.1016/j.isci.2021.103589*
26. Madhi S.A. COVID-19 herd immunity v. learning to live with the virus. *S. Afr. Med. J., 2021, vol. 111, no. 9, pp. 852–856. doi: 10.7196/SAMJ.2021.v111i9.16005*
27. McBryde E.S., Meehan M.T., Caldwell J.M., Adekunle A.I., Ogunlade S.T., Kuddus M.A., Ragonnet R., Jayasundara P., Trauer J.M., Cope R.C. Modelling direct and herd protection effects of vaccination against the SARS-CoV-2 Delta variant in Australia. *Med. J. Aust., 2021, vol. 215, no. 9. pp. 427–432. doi: 10.5694/mja2.51263*
28. Mlcochova P., Kemp S.A., Dhar M.S., Papa G., Meng B., Ferreira I.A.T.M., Datir R., Collier D.A., Albecka A., Singh S., Pandey R., Brown J., Zhou J., Goonawardane N., Mishra S., Whittaker C., Mellan T., Marwal R., Datta M., Sengupta S., Ponnusamy K., Radhakrishnan V.S., Abdullahi A., Charles O., Chattopadhyay P., Devi P., Caputo D., Peacock T., Wattal C., Goel N., Satwik A., Vaishya R., Agarwal M.; Indian SARS-CoV-2 Genomics Consortium (INSACOG); Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration; Mavousian A., Lee J.H., Bassi J., Silacci-Fegni C., Saliba C., Pinto D., Irie T., Yoshida I., Hamilton W.L., Sato K., Bhatt S., Flaxman S., James L.C., Corti D., Piccoli L., Barclay W.S., Rakshit P., Agrawal A., Gupta R.K. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature, 2021, vol. 599, no. 7883, pp. 114–119. doi: 10.1038/s41586-021-03944-y*
29. Popova A.Yu., Kasymov O.T., Smolenski V.Y., Smirnov V.S., Egorova S.A., Nurmatov Z.S., Milichkina A.M., Suranbaeva G.S., Khamitova I.V., Zueva E.V., Ivanov V.A., Nuridinova Z.N., Derkenbaeva A.A., Drobyshevskaya V.G., Sattarova G.Z., Gubanova A.V., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Verbov V.N., Likhachev I.V., Totolian A.A. SARS-CoV-2 herd immunity of the Kyrgyz population in 2021. *Med. Microbiol. Immunol., 2022, vol. 211, pp. 195–210. doi: 10.1007/s00430-022-00744-7*
30. Popova A.Yu., Tarasenko A.A., Smolenskiy V.Y., Egorova S.A., Smirnov V.S., Dashkevich A.M., Svetogor T.N., Glinskaya I.N., Skuranovich A.L., Milichkina A.M., Dronina A.M., Samoilovich E.O., Khamitova I.V., Semeiko G.V., Amvrosyeva T.V., Shmeleva N.P., Rubanik L.V., Esmanchik O.P., Karaban I.A., Drobyshevskaya V.G., Sadovnikova G.V., Shilovich M.V., Podushkina E.A., Kireichuk V.V., Petrova O.A., Bondarenko S.V. Salazhkova I.F., Tkach L.M., Shepelevich L.P., Avtukhova N.L., Ivanov V.M., Babilo A.S., Navyshnaya M.V., Belyaev N.N., Zueva E.V., Volosar L.A., Verbov V.N., Likhachev I.V., Zagorskaya T.O., Morozova N.F., Korobova Z.R., Gubanova A.V., Totolian A.A. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Republic of Belarus amid the COVID-19 pandemic. *Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 887–904. doi: 10.15789/2220-7619-HIT-1798*
31. Randolph, H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity, 2020, vol. 52, no. 5, pp. 737–741. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.012*
32. Rochman N.D., Wolf Y.I., Faure G., Mutz P., Zhang F., Koonin E.V. Ongoing global and regional adaptive evolution of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2021, vol. 118, no. 29: e2104241118. doi: 10.1073/pnas.2104241118*
33. Rostami A., Sepidarkish M., Leeflang M.M.G., Riahi S.M., Shiadeh M.N., Esfandyari S., Mokdad A.H., Hotez P.J., Gasser R.B. SARS-CoV-2 seroprevalence worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol Infect., 2021, vol. 27. no. 3, pp. 331–340. doi: 10.1016/j.cmi.2020.10.020*

34. Saban M., Kaim A., Myers V., Wilf-Miron R. COVID-19 vaccination, morbidity, and mortality during a 12-month period in Israel: can we maintain a "herd immunity" state? *Popul. Health Manag., 2022, vol. 25, no. 5, pp. 684–691. doi: 10.1089/pop.2022.0078*
35. Sadaqat W., Habib S., Tauseef A., Akhtar S., Hayat M., Shujaat S.A., Mahmood A. Determination of COVID-19 vaccine hesitancy among university students. *Cureus, 2021, vol. 13, no. 8: e17283. doi: 10.7759/cureus.17283*
36. Sanz-Leon P., Hamilton L.H.W., Raison S.J., Pan A.J.X., Stevenson N.J., Stuart R.M., Abeysuriya R.G., Kerr C.C., Lambert S.B., Roberts J.A. Modelling herd immunity requirements in Queensland: impact of vaccination effectiveness, hesitancy and variants of SARS-CoV-2. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng .Sci., 2022, vol. 380, no. 2233: 20210311. doi: 10.1098/rsta.2021.0311*
37. Shahrajabian M.H., Sun W., Chenga Q. Product of natural evolution (SARS, MERS, and SARS-CoV-2); deadly diseases, from SARS to SARS-CoV-2. *Hum. Vaccin. Immunother., 2021, vol. 17, no. 1. pp. 62–83. doi: 10.1080/21645515.2020.1797369*
38. Significant Difference Calculator (z-test). RADAR Research Company. *URL: https://radar-research.ru/software/z-test_calculator (07.04.2022)*
39. Singh D., Yi S.V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Exp. Mol. Med., 2021, vol. 53, no. 4, pp. 537–547. doi: 10.1038/s12276-021-00604-z*
40. Total population by age and sex, marital status, level of education, nationalities, language, sources of income existence in the Republic of Belarus. Statistical bulletin, Minsk, 2020. *URL: https://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/solialnaya-sfera/naselenie-i-migratsiya/naselenie/statisticheskie-izdaniya/index_17854 (23.01.2023)*
41. Totolian A.A., Smirnov V.S., Krasnov A.A., Ramsay E.S., Dedkov V.G., Popova A.Yu. COVID-19 case numbers as a function of regional testing strategy, vaccination coverage, and vaccine type. *Research Square, 2022. Preprint. doi: 10.21203/rs.3.rs-2183670/v1*
42. Van Dorp L., Houldcroft C.J., Richard D., Balloux F. COVID-19, the first pandemic in the post-genomic era. *Curr. Opin. Virol., 2021, vol. 50, pp. 40–48. doi: 10.1016/j.coviro.2021.07.002*
43. Wald A., Wolfowitz J. Confidence limits for continuous distribution functions. *The Annals of Mathematical Statistics,1939, vol.10, no. 2, pp. 105–118 // URL: www.jstor.org/stable/2235689 (10.07.2021)*
44. Worldometers. *URL: https://www.worldometers.info/coronavirus (23.12.2022)*
45. Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., Zhong W., Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci., 2020, vol. 63, no. 3, pp. 457–460. doi: 10.1007/s11427-020-1637-5*
46. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M. Osterhaus A.D. Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med., 2012, vol. 367, pp. 1814–1820. doi: 10.1056/NEJMoa1211721*
47. Zhang H., Liu X., Liu Q., Mei H., Wang Y., Cui G., Zhao S. Serological reactivity of inactivated SARS-CoV-2 vaccine based on an S-RBD neutralizing antibody assay. *Int. J. Infect. Dis., 2022, vol. 117, pp. 169–173. doi: 10.1016/j.ijid.2022.01.064*

**Авторы:**
**Попова А.Ю.**, д.м.н., профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;
**Смирнов В.С.**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Authors:**
**Popova A.Yu.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;
**Smirnov V.S.**, DSc (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Егорова С.А.**, д.м.н., зам. директора по инновациям ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Тарасенко А.А.**, зам. министра здравоохранения и главный государственный санитарный врач Республики Беларусь, Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь;
**Дашкевич А.М.**, зав. отделом эпидемиологии ГУ Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь;
**Миличкина А.М.**, к.м.н., главный врач медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Скуранович А.Л.**, главный врач ГУ Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь;
**Дрозд И.В.**, к.б.н., зав. центральной клинико-диагностической лабораторией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Глинская И.Н.**, к.м.н., зам. главного врача по эпидемиологии ГУ Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь;
**Зуева Е.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Самойлович Э.О.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакциноуправляемых инфекций ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;
**Иванов В.А.**, IT-аналитик ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Рэмзи Э.С.**, научный аналитик ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Губанова А.В.**, врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Дробышевская В.Г.**, врач клинической лабораторной диагностики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Жимбаева О.Б.**, врач Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Петрова О.А.**, врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Разумовская А.П.**, врач клинической лабораторной диагностики Центральной клинико-диагностической лаборатории Медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
**Карабан И.А.**, начальник отдела гигиены, эпидемиологии и профилактики Министерства здравоохранения, Минск, Беларусь;
**Амвросьева Т.В.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией инфекций с природным резервуаром Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;
**Шмелева Н.П.**, к.м.н., зав. лабораторией гриппа и гриппоподобных заболеваний Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;
**Рубаник Л.В.**, к.б.н., зав. лабораторией диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;
**Дронина А.М.**, зам. директора по научной работе Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;
**Тотолян Арег А.**, д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Egorova S.A.**, DSc (Medicine), Deputy Director for Innovation, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Tarasenko A.A.**, Deputy Minister and Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus, Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus;
**Dashkevich A.M.**, Head of the Department of Epidemiology, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus;
**Milichkina A.M.**, PhD (Medicine), Head Physician of the Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Skuranovich A.L.**, Head Physician of the Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus;
**Drozd I.V.**, PhD (Biology), Head of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Glinskaya I.N.**, PhD (Medicine), Deputy Head Physician for Epidemiology, Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus;
**Zueva E.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg , Russian Federation;
**Samoilovich E.O.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine-Preventable Infections, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;
**Ivanov V.A.**, IT analyst, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Ramsay E.S.**, Science Analyst, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Gubanova A.V.**, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Drobyshevskaya V.G.**, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Zhimbayeva O.B.**, Physician, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Petrova O.A.**, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Razumovskaya A.P.**, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
**Karaban I.A.**, Head of the Hygiene, Epidemiology and Diseases Prevention Department, Ministry of Health, Minsk, Belarus;
**Amvrosyeva T.V.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Infections with a Natural Reservoir, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;
**Shmeleva N.P.**, PhD (Medicine), Head of the Influenza and Influenza-Like Diseases Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;
**Rubanik L.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory for Diagnostics of Combined Bacterial Viral Infections, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;
**Dronina A.M.**, Deputy Director for Academic Affairs, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;
**Totolian Areg A.**, RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.07.2023
Принята к печати 16.08.2023

Received 03.07.2023
Accepted 16.08.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 691–698

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 691–698

# АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА У ВЗРОСЛЫХ, БОЛЬНЫХ КОРЬЮ

**А.П. Топтыгина[1,2], Т.А. Мамаева[1]**

[1] *ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия*
[2] *ФГБО УВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

**Резюме.** Корь — высококонтагиозная, вакцинопрофилактируемая антропонозная инфекция. Несмотря на политику активной вакцинации от этой инфекции населения всего мира, корь не исчезла совсем, она то затухает, то вновь появляются вспышки. Показано, что в заболевание корью вовлечены не только непривитые, что вполне понятно, но и привитые. Цель работы: исследовать особенности иммунного ответа у взрослых больных корью в условиях подъема заболеваемости в процессе элиминации этой инфекции. Исследованы 1158 сывороток крови от больных корью в возрасте от 18 до 70 лет, проживающих на территории Москвы и Московской области, методом ИФА (Euroimmun, Германия). Подавляющая часть заболевших приходится на возраст 18–40 лет — 72,36%. 69 сывороток, взятых в более поздние сроки (10–20 дней от высыпания), были исключены и рассмотрены отдельно. По уровню противокоревых IgG и их авидности были выделены: группа 1 с первичным типом иммунного ответа (582 сыворотки [53,44%]) — эти люди не были привиты в детстве; группа 2 (вторичный ответ) (446 сывороток [40,96%]) — эти люди были привиты в детстве, но утратили противокоревые антитела; 61 сыворотка с промежуточным уровнем параметров отнесена в группу 3. Для уточнения типа иммунного ответа группы 3 проведен дополнительный анализ спектра субклассов противокоревых антител. Показано, что в этой группе выявляется смешанный тип ответа: 31 человек отвечал с преобладанием первичного типа, а 30 человек — с преобладанием вторичного типа иммунного ответа. При этом 40 человек из 61 были вакцинированы от кори за 1–3 мес. до заболевания, то есть заболевание наложилось на становление поствакцинального иммунитета. Таким образом, выявленная нами ранее тенденция к утрате поствакцинального иммунитета среди старших школьников и молодых взрослых и вовлечение этих привитых в детстве людей в эпидемический процесс продолжает усугубляться.

***Ключевые слова:*** *корь, антитела, гуморальный иммунитет, первичный иммунный ответ, вторичный иммунный ответ, авидность.*

## ANALYZING FEATURES OF MEASLES IMMUNE RESPONSE IN ADULT PATIENTS

**Toptygina A.P.[a,b], Mamaeva T.A.[a]**

[a] *G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*
[b] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Measles is a highly contagious, vaccine-preventable anthroponotic infection. Despite the policy of active measles vaccination for entire global population, measles has not completely disappeared, it wanes and waxes in outbreaks. It has been shown that not only the unvaccinated but also the vaccinated, which is quite understandable, subjects are in-

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

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

**Для цитирования:**
Топтыгина А.П., Мамаева Т.А. Анализ особенностей иммунного ответа у взрослых, больных корью // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 691–698. doi: 10.15789/2220-7619-AOM-13306

**Citation:**
Toptygina A.P., Mamaeva T.A. Analyzing features of measles immune response in adult patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 691–698. doi: 10.15789/2220-7619-AOM-13306



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOM-13306

volved in measles progression. The study was aimed at assessing features of the immune response in adult measles patients at rise in disease incidence upon its eradication. 1.158 blood sera from measles patients aged 18 to 70 living in Moscow and the Moscow region were studied by ELISA (Euroimmun, Germany). The vast majority of subjects were aged 18–40 years comprising 72.36% cases. 69 sera collected at a later timepoint (10–20 days from rash onset) were excluded and analyzed separately. According to anti-measles IgG and avidity level, the data were stratified as follows: group 1 with a primary type of immune response — 582 sera (53.44%), not vaccinated in childhood; group 2 (secondary response) — 446 sera (40.96%), vaccinated in childhood, but lost anti-measles antibodies; group 3 with intermediate level of parameters — 61 sera. To clarify the type of immune response in group 3, an additional analysis of the spectrum of anti-measles antibody subclasses was carried out. It was shown that a mixed type of response was detected in this group: 31 subjects mainly had primary immune response, and 30 subjects — secondary immune response. At the same time, 40 out of 61 subjects were vaccinated against measles 1–3 months prior to disease onset, i.e., it was overlapped on arising post-vaccination immunity. Thus, the previously identified trend towards the loss of post-vaccination immunity among older schoolchildren and young adults vaccinated in childhood who are involved in the epidemic process continues to worsen.

***Key words:*** *measles, antibodies, humoral immunity, primary immune response, secondary immune response, avidity.*

## Введение

Корь — высококонтагиозная, вакцинопрофилактируемая антропонозная инфекция. В связи с достижением высокого охвата прививками против кори казалось, что корь элиминирована, то есть прекратилась непрерывная передача инфекции, длящаяся более 12 мес. Однако корь не исчезла совсем: она то затухает, то вновь появляются вспышки [19]. Несмотря на то что США давно уже считаются территорией элиминировавшей корь, вспышки этой инфекции регулярно случаются в разных штатах. Была рассчитана цена средней вспышки, и она составила 152 308$, а средняя цена одного случая заболевания корью — 32 805$, что на несколько порядков превышает стоимость дозы вакцины [22]. В 2019 г. во всем мире отмечался подъем заболеваемости корью [17]. Например, в Казахстане в 2019 г. зарегистрировали 13 873 случая кори, из них 3684 среди взрослых [2]. В Российской Федерации по данным государственной статистики был зарегистрирован 4491 случай кори. Многие исследователи отмечали, что далеко не у всех привитых от кори в детстве взрослых сохраняются противокоревые антитела [3, 11]. Важно, что в заболевание корью оказываются вовлечены не только непривитые, что вполне понятно, но и привитые. Так в Калифорнии в 2014 г. среди заболевших корью 25% были привиты в детстве [14]. Даже среди заболевших корью детей в 2019 г., по данным ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского, 10% были ранее привиты от кори [6]. На фоне пандемии COVID-19 и применения карантинных мероприятий (локдауны, ношение масок и т. п.) заболеваемость корью снизилась, но после отмены ограничительных мер корь вновь появилась [18]. Вспышки на территориях, элиминировавших корь, могут происходить из-за недостаточного охвата вакцинацией [20] или в связи с утратой поствакцинального иммунитета [21]. Поэтому весьма важно продолжать исследования поствакцинального иммунитета против кори для оценки продолжительности его поддержания в условиях элиминации вируса и отсутствия естественного бустирования.

Цель работы: исследовать особенности иммунного ответа у взрослых больных корью в условиях подъема заболеваемости в процессе элиминации этой инфекции.

## Материалы и методы

В простом сравнительном исследовании были проанализированы 1158 сывороток крови от больных корью за 2019г. в возрасте от 18 до 70 лет, проживающих на территории Москвы и Московской области. Подтверждение коревой инфекции осуществляли на основании модифицированного дифференциально-диагностического алгоритма [5]. При первичном анализе сыворотки, взятые с нарушением сроков, предусмотренных рекомендациям ВОЗ, (на 10–20 день после появления сыпи) (69 образцов) были отнесены в отдельную группу и анализировались отдельно. Оставшиеся 1089 сывороток были разделены на следующие возрастные группы: 18–30 лет (молодежь), 31–40 лет и 41–50 лет (группы среднего возраста) и более 50 лет (старший возраст). Количество сывороток, вошедших в ту или иную группу, указано в таблицах ниже. Исследования проводились на базе лаборатории Национального научно-методического центра по кори и краснухе (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора). Сыворотки хранили при –30°С до использования. Определение уровней антител и их авидности осуществляли методом иммуноферментного анализа на тест-системах «Anti-Measles Virus NP ELISA» (IgM), «Anti-Measles Viruses ELISA» (IgG) и «Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA» («Euroimmun», Германия). Результаты выражали, согласно нормативно-технической доку-

ментации на используемые наборы: для IgM — в единицах оптической плотности (о.е.), для IgG — в Ме/мл, авидность — по проценту диссоциации антител (индекс авидности). При этом, если индекс авидности был менее 40%, антитела расценивались как низкоавидные, если более 60% — высокоавидные, а от 40 до 60% — промежуточный результат. Для определения субклассов специфичных к антигенам вируса кори IgG применяли модификацию метода [10]. Использовали 96-луночные панели от набора «Anti-Measles Viruses ELISA» (IgG) (Euroimmun, Германия), но вместо конъюгата из набора мы добавляли в лунки моноклональные антитела, меченные пероксидазой: анти-IgG1 (клон 10G/2C11), анти-IgG2 (клон 23G/3C7), анти-IgG3 (клон 22G/5G12) и анти-IgG4 (клон 20G/5C7) (Полигност, Санкт-Петербург) в концентрации 1 мкг/мл. Для сопоставления результатов мы использовали стандартную сыворотку, содержащую специфические антитела к кори всех четырех субклассов IgG. Оценку результатов тестирования проводили с помощью микропланшетного фотометра «Multiskan FC» (Thermo scientific, Финляндия) при длине волны 450 нм против 620 нм.

Полученные результаты были обработаны методами непараметрической статистики с вычислением медианы (Ме), первого и третьего квартилей (LQ–HQ). Различия между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, уровень $p < 0,05$ расценивался как значимый.

## Результаты

Распределение уровней противокоревых IgM, IgG и авидности антител по возрастным группам представлено в табл. 1. Из таблицы видно, что подавляющая часть заболевших приходится на возрастные группы 18–30 лет (35,45%) и 31–40 лет (36,91%) от состава всех больных корью взрослых. Уровни IgM и IgG антител и их авидность постепенно снижаются с возрастом, при этом максимум выявляется в возрастной группе 18–40 лет. Интервалы между первым и третьим квартилем сильно различаются в разных возрастных группах. Это свидетельствует о неоднородности данных в этих возрастных группах. Ранее было показано, что существуют значимые различия в уровнях антител при первичном и вторичном типе ответа на вирус кори [9]. Так, невысокий уровень низкоавидных IgG-антител типичен для первичного иммунного ответа, а высокий уровень высокоавидных IgG-антител (более 5 МЕ/мл) характерен для вторичного иммунного ответа. По этому признаку исследованные сыворотки были разделены на 3 группы. В группу 1 (первичный ответ) были отнесены 582 сыворотки (53,44%), в группу 2 (вторичный ответ) — 446 сывороток (40,96%). Однако 61 сыворотка (5,6%) не укладывалась в заданные критерии: уровень IgG-антител в них был менее 5 МЕ/мл, но авидность при этом была от 50 до 98%, то есть это были высокоавидные антитела, или антитела с промежуточной авидностью. Эти сыворотки были выделены в группу 3 (рис. 1). Эти 3 группы были неравномерно представлены среди больных корью разных возрастов.

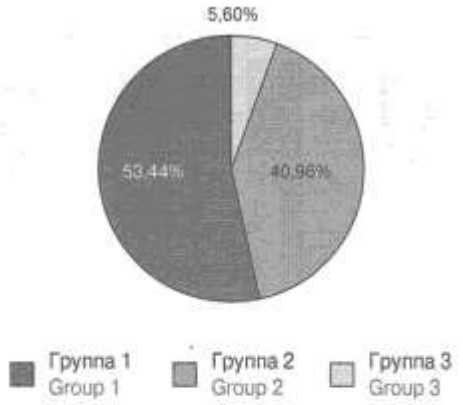


**Рисунок 1. Распределение больных корью по типу иммунного ответа на инфекцию**
Figure 1. Distribution of measles patients by type of specific immune response

Распределение по возрастным группам типов иммунного ответа представлено на рис. 2. Из рисунка видно, что в группе молодых взрослых (18–30 лет) уровень отвечающих первичным типом

**Таблица 1. Распределение уровней противокоревых антител по возрастным группам, Ме (LQ–HQ)**
Table 1. Age-related distribution of measles antibody levels, Me (LQ–HQ)

| **Возраст**<br>Age | **18–30 лет**<br>18–30 years | **31–40 лет**<br>31–40 years | **41–50 лет**<br>41–50 years | **> 50 лет**<br>> 50 years |
|---|---|---|---|---|
| **Количество человек в группе**<br>Number in group | 386 | 402 | 225 | 76 |
| **IgM (о.е.)**<br>IgM (o.u.) | 1,32<br>(0,61–2,36) | 1,30<br>(1,60–2,30) | 1,16<br>(0,56–2,15) | 0,91<br>(0,47–1,78) |
| **IgG (МЕ/мл)**<br>IgG (ME/ml) | 0,94<br>(0,38–24,08) | 1,87<br>(0,51–23) | 1,07<br>(0,47–20,03) | 0,74<br>(0,32–3,87) |
| **Авидность (%)**<br>Avidity (%) | 78<br>(15–98) | 72<br>(20–97) | 64<br>(24–97) | 47<br>(22–89,25) |

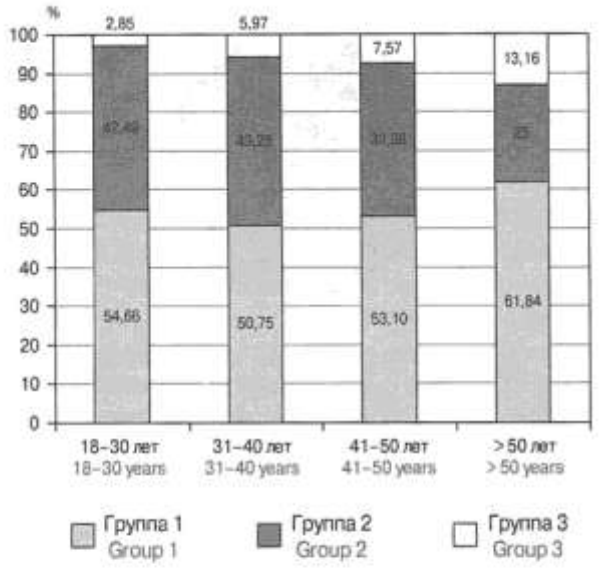


**Рисунок 2. Возрастная структура больных корью в зависимости от типа иммунного ответа**

Figure 2. Age structure of measles patients related to type of immune response

ответа составлял 54,66% и колебался возле этого уровня в группах 31–40 и 41–50 лет. Иными словами, примерно половина заболевших в этих возрастных группах не была привита от кори, а вторая половина, видимо, была привита в детстве, но утратила в процессе жизни противокоревые антитела. В группе старше 50 лет уровень отвечающих первичным типом иммунного ответа немногим превышал 60%. Также из рисунка видно, что группа 3 увеличивалась с возрастом: от 2,85% в возрастной группе 18–30 лет до 13,16% в группе старше 50 лет, что выглядит неслучайным.

Рассмотрим подробнее гуморальный противокоревой ответ в этих трех группах (табл. 2). В группе 1 (первичный иммунный ответ) основная часть заболевших приходится на молодой возраст 18–40 лет (415 человек, 71,3%). Во всех сыворотках этой группы были обнаружены положительные противокоревые IgM-антитела. К сожалению, для IgM-антител нет калибраторов, поэтому стандартно уровень этих антител оценивается как положительный, отрицательный или «серая зона». Однако для исследовательских целей можно приблизительно оценить уровень IgM ответа в единицах оптической плотности. При таком способе оценки можно увидеть, что уровень IgM-антител был максимален в возрастной группе 18–30 лет, а затем постепенно снижался с возрастом. В первой группе не во всех сыворотках были обнаружены противокоревые IgG-антитела, уровень серопозитивных колебался около 66%. Интересно, что медианы концентрации противокоревых IgG-антител, посчитанные для серопозитивных сывороток, практически не различались в зависимости от возраста и незначимо колебались

**Таблица 2. Параметры гуморального ответа на вирус кори в зависимости от возраста и типа иммунного ответа, Me (LQ–HQ)**

Table 2. Parameters of humoral response to measles virus related to age and type of immune response, Me (LQ–HQ)

| **Возраст**<br>Age | **18–30 лет**<br>18–30 years | **31–40 лет**<br>31–40 years | **41–50 лет**<br>41–50 years | **> 50 лет**<br>> 50 years |
|---|---|---|---|---|
| **Группа 1, количество человек (%)**<br>Group 1, number of subjects (%) | 211 (36,25%) | 204 (35,05%) | 120 (20,62%) | 47 (8,08%) |
| **IgM (о.е.)**<br>IgM (o.u.) | 1,99 (1,22–2,93) | 1,85 (1,31–2,75) | 1,61 (0,97–2,51) | 1,36 (0,71–1,87) |
| **IgG (МЕ/мл), % серопозитивных**<br>IgG (ME/ml), % seropositive | 0,55 (0,41–0,80); 63,51% | 0,69 (0,49–0,94); 68,14% | 0,53 (0,23–0,86); 64,17% | 0,59 (0,38–0,84); 65,96% |
| **Авидность (%)**<br>Avidity (%) | 12 (8–22) | 15 (9–36) | 19 (10–38) | 26 (12–33) |
| **Группа 2, количество человек (%)**<br>Group 2, number of subjects (%) | 164 (36,77%) | 174 (39,01%) | 89 (19,96%) | 19 (4,26%) |
| **IgM (о.е.), % серопозитивных**<br>IgM (o.u.), % seropositive | 1,02 (0,63–1,94); 66,46% | 1,03 (0,68–1,92); 65,52% | 1,27 (0,72–2,39); 70,79% | 0,62 (0,49–1,53); 57,89% |
| **IgG (МЕ/мл)**<br>IgG (ME/ml) | 25,8 (22,64–28,61) | 24,1 (21,83–26,8) | 22,84 (19,48–25,7) | 20,4 (17,12–24,16) |
| **Авидность (%)**<br>Avidity (%) | 98 (95–100) | 98 (94–100) | 98 (95–100) | 97 (90–99) |
| **Группа 3, количество человек (%)**<br>Group 3, number of subjects (%) | 11 (18,04%) | 24 (39,34%) | 16 (26,23%) | 10 (16,39%) |
| **IgM (о.е.), % серопозитивных**<br>IgM (o.u.), % seropositive | 1,60 (1,03–3,33); 100% | 1,61 (1,06–2,58); 83,33% | 1,22 (0,98–2,19); 82,35% | 0,95 (0,74–1,99); 80% |
| **IgG (МЕ/мл)**<br>IgG (ME/ml) | 1,62 (0,82–3,12) | 2,44 (1,86–2,94) | 1,84 (0,99–2,47) | 1,61 (1,31–2,62) |
| **Авидность (%)**<br>Avidity (%) | 62 (51–72) | 63 (58–68) | 58 (56–72) | 61 (57–70) |

около 0,57 Ме/мл. При этом авидность антител была низкой с незначительной тенденцией к подъему в старших возрастных группах. Из этих расчетов были исключены 69 сывороток, взятые в более поздние сроки (через 10–20 дней после появления сыпи), однако по своим характеристикам (невысокий уровень низкоавидных IgG) они соответствовали первичному типу иммунного ответа, поэтому мы сопоставили эту дополнительную группу с результатами группы 1. Уровень IgM-антител в сыворотках, взятых на поздних сроках, был ниже, чем в группе 1: 1,36 (0,99–1,82) о.е., уровень IgG — значимо выше: 0,94 (0,68–1,74) Ме/мл ($p < 0,05$), авидность не отличалась от группы 1. Эти различия, по-видимому, отражают процесс созревания первичного иммунного ответа на вирус кори у ранних реконвалесцентов.

Для группы 2 (вторичный иммунный ответ) пик заболевших также пришелся на группы 18–30 и 31–40 лет (338 чел., 75,78% от состава группы). В этой группе только $^2/_3$ сывороток имели положительные IgM-антитела, но все сыворотки содержали высокий уровень (более 10 Ме/мл) высокоавидных антител, медиана авидности составила 98%. Отмечалась тенденция к снижению с возрастом уровня IgG-антител (см. табл. 2).

Наиболее интересной нам показалась группа 3. Пик заболевших приходился на возрастную группу 31–40 лет. Процент IgM-серопозитивных сывороток менялся с возрастом от 100% в возрасте 18–30 лет, до 80% в старшем возрасте. Уровень IgG-антител значимо ($p < 0,05$) превышал соответствующий уровень группы 1 во всех возрастных группах, как и процент авидности антител, хотя он был значимо ниже ($p < 0,01$), чем в группе 2. Ранее было показано, что при первичном иммунном ответе преобладают антитела субкласса IgG3, а при вторичном иммунном ответе — IgG1 [7]. Поэтому мы протестировали все сыворотки группы 3 на соотношение субклассов IgG-антител к вирусу кори. Рассчитанные нами ранее cut off для IgG1 (46,84%) и IgG3 (42,8%) антител у больных корью [8] позволили разделить группу 3 на отвечающих преимущественно по первичному (31 человек) (подгруппа 3а), или по вторичному типу (30 человек) (подгруппа 3б), иммунного ответа (рис. 3). После такого разделения авидность в подгруппе 3а составила 60 (54–67)%, а в подгруппе 3б — 66 (60–74)%, однако эти различия оказались не значимыми. Дополнительное исследование анамнеза заболевания людей, отнесенных в группу 3, показало, что все они имели клиническую картину кори с типичными высыпаниями. При этом 40 человек из 61 были вакцинированы от кори за 1–3 мес. до заболевания.

## Обсуждение

Проведенные нами исследования выявили важные закономерности. Ранее нами было показано, что в 2013 г. вторичным типом иммунного ответа реагировали взрослые в группах 18–30 (12,1%), 31–40 (18%) и 41–50 лет (15,2%) [11]. В 2019 г. первичным типом иммунного ответа реагируют только 53,44% заболевших, а вторичный ответ продемонстрировали уже более 40% взрослых больных. Следовательно, почти половина заболевших взрослых была привита в детстве, но утратила в процессе жизни противокоревые антитела. Это означает, что выявленная нами тенденция к утрате поствакцинального иммунитета среди старших школьников и взрослых и вовлечение этих привитых в детстве людей в эпидемический процесс продолжает усугубляться. Подобные результаты были получены Cherry и Zahn при расследовании вспышки кори в США. Так 11% заболевших имели подтвержденную двудозовую вакцинацию, при этом срок от последней вакцинации в среднем был 16,7 лет, а размах — от 6 до 23,6 лет) [12]. Неоднократно поднимался и обсуждался вопрос о необходимости тестирования учеников 10–11 классов на наличие IgG-антител к вирусу кори

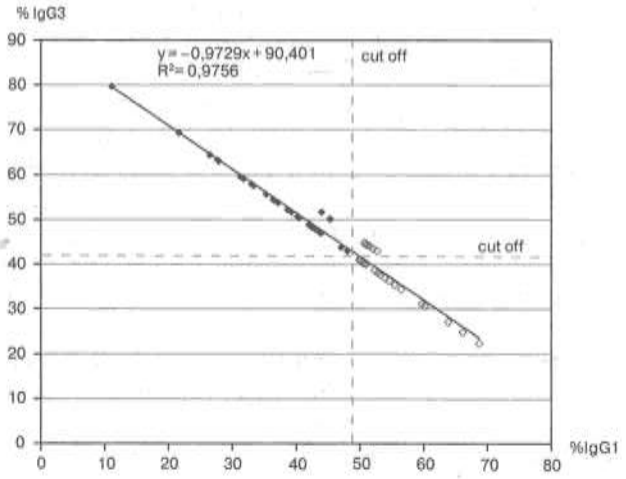


**Рисунок 3. Распределение пациентов группы 3 в зависимости от соотношения IgG1 и IgG3 субклассов противокоревых антител**

Figure 3. Distribution of group 3 patients based on measles-specific IgG1/IgG3 antibody subclass ratio

**Примечание.** Черными маркерами обозначены пациенты с преимущественно первичным типом иммунного ответа, белыми маркерами обозначены пациенты с преимущественно вторичным типом иммунного ответа. Пунктирными линиями обозначены cut off для разделения первичного и вторичного типа иммунного ответа.

Note. Black and white markers indicate patients showing predominantly primary and secondary type of immune response, respectively. Dotted lines indicate cut off threshold to separate primary and secondary types of immune response.

и вакцинации серонегативных [4, 11]. Такая стратегия позволила бы исключить из эпидемического процесса значительную часть молодых взрослых, а ведь именно эта группа является молодыми родителями, способными инфицировать своих маленьких, еще не привитых от кори детей. Конечно, утрата долгоживущих плазмоцитов, синтезирующих антитела не означает полную утрату противокоревого иммунитета. В-клетки памяти несут после вакцинации уже перестроенные высокоавидные и преимущественно IgG1-рецепторы, однако сами они антител не производят до тех пор, пока не встретят вновь вирус кори. Ответ В-клеток памяти развивается намного быстрее, чем ответ наивных В-клеток, однако не мгновенно, поэтому люди, утратившие антитела заболевают, но отвечают вторичным иммунным ответом (высокий уровень высокоавидных антител).

Хотя группа 3 составила всего 5,6% заболевших, само появление ее весьма настораживает. Несмотря на высокий уровень разделительной модели, основанной на определении соотношения субклассов противокоревых антител, в сыворотках крови группы 3, мы, по-видимому, наблюдаем смешанный тип иммунного ответа. При этом у 40 человек, недавно привитых от кори инфицирование, вероятно, наложилось на процесс формирования поствакцинального иммунитета, тогда как у 21 человека такой смешанный тип ответа возник, очевидно, по другой причине. Такая ситуация может возникнуть, если привитый в детстве человек утратил не только плазмоциты, синтезирующие противокоревые антитела, но и часть В-клеток памяти, способных распознать вирус кори. В этом случае в ответ на повторную встречу с вирусом кори параллельно развиваются 2 процесса: вторичный ответ оставшейся еще части В-клеток памяти и первичный ответ наивных В-клеток, которые постоянно формируются в костном мозге. От того, сколь большая или малая часть В-клеток памяти была утрачена и насколько вовлечены наивные В-клетки в этот ответ на вирус кори зависит, будет ли такой смешанный ответ развиваться с преобладанием первичного (подгруппа 3а) или вторичного (подгруппа 3б) иммунного ответа. Вероятно, что на этот баланс будет также влиять первичная инфицирующая доза вируса у каждого конкретного пациента.

Причин утраты противокоревого иммунитета у привитых может быть несколько. Так хорошо известны случаи первичных вакцинальных неудач, когда антитела на вирус кори вообще не формируются после вакцинации и даже ревакцинации [1]. Также известны случаи вторичных вакцинальных неудач, когда появившиеся противокоревые антитела быстро исчезают из крови. На уровень противокоревых антител, формирующихся после вакцинации, могут оказывать влияние полиморфизм HLA, которые отвечают за распознавание Т-хелперами антигенов вируса кори [16], различия в экспрессии рецепторов, которые вирус кори использует для прикрепления к клетке [13], полиморфизмы в некоторых молекулах иммунного ответа [15]. Также состояние иммунной системы на момент вакцинации влияет на результат прививки: показано, что уровень некоторых параметров иммунной системы оказывает как позитивное, так и негативное влияние на уровень противокоревых антител после вакцинации [23].

Таким образом, в результате проведенного исследования удалось показать, что выявленная нами ранее тенденция к утрате поствакцинального иммунитета среди старших школьников и молодых взрослых и вовлечение этих привитых в детстве людей в эпидемический процесс продолжает усугубляться. Пик заболеваемости корью приходится на возраст 18–40 лет, кроме того, что это наиболее активная и подвижная группа населения, это также молодые родители, которые могут инфицировать своих еще не привитых детей, поэтому крайне важно наладить тестирование на наличие противокоревого иммунитета школьников 10–11 классов и вакцинацию серонегативных. Это поможет действительно взять под контроль заболеваемость корью и элиминировать ее в дальнейшем.

## Список литературы/References


1. Ерещенко А.А. Лабораторный мониторинг эффективности поствакцинального противокоревого иммунного ответа // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22, № 3. С. 563–568. [Ereshchenko A.A. Laboratory monitoring of postvaccination measles immunity. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2020, vol. 22, no. 3, pp. 563–568. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-LMO-1876*
2. Жузжасарова А.А., Баешева Д.А., Турдалина Б.Р., Сейдуллаева А.Ж., Алтынбекова А.В., Мынжанова А., Кушугулова А.Р. Показатель вакцинального статуса и заболеваемости корью в республике Казахстан // Наука и здравоохранение. 2021. Т. 23, № 4. С. 155–162. [Zhuzzhasarova A.A., Baesheva D.A., Turdalina B.R., Seidullayeva A.Zh., Altynbekova A.V., Mynzhanova A., Kushugulova A.R. The indicator of the vaccination status and the incidence of measles in the Republic of Kazakhstan. *Nauka i zdravookhranenie = Science and Healthcare, 2021, vol. 23, no. 4, pp. 155–162. (In Russ.)*] *doi: 10.34689/SH.2021.23.4.017*
3. Костинов М.П., Журавлев П.И., Локтионова М.Н., Шмитько А.Д., Полищук В.Б., Татаринчик А.А., Смирнова О.А., Фурсов И.С. Сопоставление напряженности гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью в различных возрастных группах из числа медицинских работников г. Москвы // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 1. С. 27–36.

[Kostinov M.P., Zhuravlev P.I., Loktionova M.N., Shmitko A.D., Polishchuk V.B., Tatarinchik A.A., Smirnova O.A., Fursov I.S. Comparison of measles incidence in different age groups with the intensity of specific humoral immunity in healthcare workers in Moscow. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 27–36. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0507-4088-85*

4. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Полищук В.Б., Рыжова А.А., Черданцев А.П. Необходима ли третья доза вакцины против кори — взгляд иммунолога // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 88–94. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Solovieva I.L., Savisko A.A., Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Cherdantsev A.P. Is a third dose of measles vaccine necessary — an immunologist's view. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2016, no. 5, pp. 88–94. (In Russ.)*]
5. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Наумова М.А, Говорухина М.В., Калашникова Н.А., Бичурина М.А., Мукомолов С.Л. Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 55–62. [Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Naumova M.A., Govoruhina M.V., Kalashnikova N.A., Bichurina M.A., Mukomolov S.L. Algorithm of laboratory confirmation and differential diagnosis of measles infection at the stage of the measles elimination program in Russia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 55–62. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-55-62*
6. Молочкова О.В., Ковалев О.Б., Косырева М.А., Ильина Н.О., Шамшева О.В., Гетманова Е.Н., Егорова Н.Ю., Корсунский А.А., Галеева Е.В., Гужавина А.А. Характеристика кори у детей в период подъема заболеваемости в 2019 году // Детские инфекции. 2022. Т. 21, № 4. С. 27–31. [Molochkova O.V., Kovalev O.B., Kosyreva M.A., Ilyina N.O., Shamsheva O.V., Getmanova E.N., Egorova N.Yu., Korsunsky A.A., Galeeva E.V., Guzhavina A.A. Characteristics of measles in children during the rise of morbidity in 2019. *Detskie infekcii = Children's Infections, 2022, vol. 21, no. 4, pp. 27–31. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2022-21-4-27-31*
7. Топтыгина А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 1. С. 7–14. [Toptygina A.P. Common mechanisms of specific humoral immune response' shaping and sustaining by the example of immune response to measles and rubella viruses. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 7–14. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-7-14*
8. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А. Динамика синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи и эпидемического паротита // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13 (21), № 1. С. 78–85. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A. Dynamics of synthesis and circulation of subclasses specific IgG in the immune response to the vaccine against measles, rubella, mumps. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2019, vol. 13 (21), no. 1, pp. 78–85. (In Russ.)*] *doi: 10.31857/S102872210005024-1*
9. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 3. С. 243–250. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Peculiarities of specific humoral measles immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 243–250. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-243-250*
10. Топтыгина А.П., Пухальский А.Л., Мамаева Т.А., Алешкин В.А., Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь // Бюллетень экспериментальной биологии. 2004. Т. 137, № 3. С. 293–295. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A., Pukhalskii A.L. Spectrum of anti-measles immunoglobulin G subclasses in convalescents after measles. *Byulleten' eksperimental'noi biologii = Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 259–261. (In Russ.)*] *doi: 10.1023/B:BEBM.0000031564.27747.b4*
11. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимирова Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 341–348. [Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 341–348. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348*
12. Cherry J.D., Zahn M. Clinical characteristics of measles in previously vaccinated and unvaccinated patients in California. *Clin. Infect. Dis., 2018, vol. 67, no. 9, pp. 1315–1319. doi: 10.1093/cid/ciy286*
13. Clifford H.D., Richmond P., Khoo S.K., Zhang G., Yerkovich S.T., le Souëf P.N., Hayden C.M. SLAM and DC-SIGN measles receptor polymorphisms and their impact on antibody and cytokine responses to measles vaccine. *Vaccine, 2011, vol. 29, no. 33, pp. 5407–5413. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.068*
14. Doll M.K., Correira J.W. Revisiting the 2014–15 Disneyland measles outbreak and its influence on pediatric vaccinations. *Hum. Vacc. Immunothrap., 2021, vol. 17, no. 11, pp. 4210–4215. doi: 10.1080/21645515.2021.1972707*
15. Haralambieva I.H., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Whitaker J.A., Poland G.A. Variability in humoral immunity to measles vaccine: new developments. *Trends Mol. Med., 2015, vol. 21, no. 12, pp. 789–801. doi: 10.1016/j.molmed.2015.10.005*
16. Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Kennedy R.B., Jacobson R.M., Poland G.A. The genetic basis for inter-individual immune response variation to measles vaccine: new understanding and new vaccine approaches. *Expert. Rev. Vaccines, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 57–70. doi: 10.1586/erv.12.134*
17. Martin E.K., Shearer M.P., Trotochaud M., Nuzzo J.B. Outbreak response operations during the US measles epidemic, 2017–19. *BMC Public Health., 2021, vol. 21, no. 1: 620. doi: 10.1186/s12889-021-10652-9*
18. Nomhwange T., Abede M., Baptiste A.E.J., Musa A., Yusuf A., Yusuf M., Wagai J., Shettima A., Meleh S., Banda R., Braka F., Luce R., Masresha B. Measles outbreak response immunization during the COVID-19 pandemic: lessons from Borno State, Nigeria. *Pan Afr. Med. J., 2022, vol. 41: 104. doi: 10.11604/pamj.2022.41.104.28162*
19. Orenstein W.A., Strebel P.M., Papania M., Sutter R.W., Bellini W.J., Cochi S.L. Measles eradication: is it in our future? *Am. J. Public Health., 2000, vol. 90, pp. 1521–1525. doi: 10.2105/ajph.90.10.1521*
20. Patel M., Lee A.D., Redd S.B., Clemmons N.S., McNall R.J., Cohn A.C., Gastañaduy P.A. Increase in measles cases — United States, January 1 — April 26, 2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep., 2019, vol. 68, no. 17, pp. 402–404. doi: 10.15585/mmwr.mm6817e1*

21. Phadke V.K., Bednarczyk R.A., Salmon D.A., Omer S.B. Association between vaccine refusal and vaccine-preventable diseases in the United States: a review of measles and pertussis. *JAMA, 2016, vol. 315, no. 11, pp. 1149–1158. doi: 10.1001/jama.2016.1353*
22. Pike J., Leidner A.J., Gastañaduy P.A. A review of measles outbreak cost estimates from the United States in the postelimination era (2004–2017): estimates by perspective and cost type. *Clin. Infect. Dis., 2020, vol. 71, no. 6, pp. 1568–1576. doi: 10.1093/cid/ciaa070*
23. Toptygina A.P., Grebennikov D., Bocharov G. Prediction of specific antibody- and cell-mediated responses using baseline immune status parameters of individuals received measles-mumps-rubella vaccine. *Viruses, 2023, vol. 15, no. 2: 524. doi: 10.3390/v15020524*

**Авторы:**
**Топтыгина А.П.**, д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБО УВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
**Мамаева Т.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

**Authors:**
**Toptygina A.P.**, DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;
**Mamaeva T.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.06.2023
Принята к печати 28.08.2023

Received 15.06.2023
Accepted 28.08.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 699–708

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 699–708

# IgG-АНТИТЕЛА К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ БЕЛКАМ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРЕДНИМИ УВЕИТАМИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

**Г.И. Кричевская[1], Н.В. Балацкая[1], Г.И. Алаторцева[2], Е.С. Сорожкина[1], Л.А. Ковалева[1], И.Г. Куликова[1], В.В. Доценко[2], Л.Н. Нестеренко[2], Л.Н. Лухверчик[2]**

[1] *ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия*
[2] *ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*

**Резюме.** *Актуальность.* Цитомегаловирус (CMV), β-герпесвирус человека, после попадания в организм человека пожизненно персистирует в латентной форме. Возникающая периодически реактивация CMV может вызывать заболевание разных органов, включая глаз, не только при иммуносупрессии, но и у иммунокомпетентных людей. Благодаря своим иммуносупрессивным свойствам персистирующий CMV участвует в патогенезе заболеваний разной этиологии. Целью данного исследования было изучение особенностей антителообразования к шести индивидуальным белкам CMV и проведение корреляционного анализа его взаимосвязи с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов крови у пациентов с передними увеитами разной степени тяжести (без гипопиона — легкое течение, с гипопионом — более тяжелое течение). *Материалы и методы.* Обследовано 36 пациентов с передними увеитами. I группу составили 20 пациентов без гипопиона, II группу — 16 человек с гипопионом. Патогномоничные для ЦМВ-обусловленных передних увеитов клинические симптомы (глаукомо-циклитические кризы, секторальная атрофия радужки) отсутствовали. В сыворотках крови в иммуноферментном анализе определяли IgG-антитела к CMV (маркеры хронической инфекции), в линейном иммуноанализе — антитела к индивидуальным рекомбинантным антигенам CMV: основному неструктурному предраннему белку (IE), ДНК-связывающему фосфопротеину p52, фосфопротеинам тегумента p150, p65, p28, гликопротеину оболочки GB-AD. Методом проточной цитометрии исследовали субпопуляционный состав лимфоцитов: Т-лимфоциты ($CD3^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD8^-$), Т-цитотоксические ($CD3^+CD4^-CD8^+$), Т-дубль-позитивные ($CD3^+CD4^+CD8^+$), натуральные киллеры ($CD16^+CD56^+$), В-лимфоциты ($CD19^+$), иммунорегуляторный индекс ($CD4^+/CD8^+$). Статистический анализ проводили с помощью программы StatTech v. 3.0.2 (ООО «Статтех», Россия). *Результаты.* При передних увеитах легкого течения обнаружено статистически значимое повышение относительного содержания $CD16^+CD56^+$ и снижение абсолютного числа $CD3^+CD8^+$ по сравнению с передними увеитами более тяжелого

**Адрес для переписки:**
Кричевская Галина Исааковна
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19, ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 624-57-13 (служебн.), 8 985 191-92-34 (моб.).
E-mail: gkri@yandex.ru

**Contacts:**
Galina I. Krichevskaya
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19., Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases.
Phone: +7 (495) 624-57-13 (office), +7 985 191-92-34 (mobile).
E-mail: gkri@yandex.ru

**Для цитирования:**
Кричевская Г.И., Балацкая Н.В., Алаторцева Г.И., Сорожкина Е.С., Ковалева Л.А., Куликова И.Г., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н. IgG-антитела к индивидуальным белкам цитомегаловируса и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с передними увеитами разной степени тяжести // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 699–708. doi: 10.15789/2220-7619-IAT-8875

**Citation:**
Krichevskaya G.I., Balatskaya N.V., Alatortseva G.I., Sorozhkina E.S., Kovaleva L.A., Kulikova I.G., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N. IgG-antibodies to individual cytomegalovirus proteins and the peripheral blood lymphocyte subset profile in patients with anterior uveitis of varying severity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 699–708. doi: 10.15789/2220-7619-IAT-8875



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IAT-8875

течения. Только в группе пациентов с наличием гипопиона (более тяжелое течение) выявлена прямая корреляционная заметная достоверная связь между уровнями антител к антигенам IE, p65, p28 и содержанием дубль-позитивных клеток ($CD3^+CD4^+CD8^+$) и обратная достоверная связь между уровнями антител к антигенам IE, p65 и p52 и $CD19^+$ лимфоцитами. *Заключение.* Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе единичными сообщениями о роли дубль-позитивных лимфоцитов в патогенезе тяжелых форм ряда вирусных заболеваний. Необходимы дальнейшие исследования влияния индивидуальных вирусных антигенов на содержание $CD3^+CD4^+CD8^+$ у пациентов с хронической ЦМВИ для подтверждения роли дубль-позитивных лимфоцитов в патогенезе более тяжелого течения передних увеитов.

***Ключевые слова:*** *антигены ЦМВ, субпопуляции лимфоцитов, дубль-позитивные лимфоциты, передние увеиты, линейный иммуноанализ, гипопион.*

## IgG-ANTIBODIES TO INDIVIDUAL CYTOMEGALOVIRUS PROTEINS AND THE PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSET PROFILE IN PATIENTS WITH ANTERIOR UVEITIS OF VARYING SEVERITY

**Krichevskaya G.I.[a], Balatskaya N.V.[a], Alatortseva G.I.[b], Sorozhkina E.S.[a], Kovaleva L.A.[a], Kulikova I.G.[a], Dotsenko V.V.[b], Nesterenko L.N.[b], Lukhverchik L.N.[b]**

[a] *Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation*
[b] *I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** *Background.* Cytomegalovirus (CMV), a human beta-herpesvirus, persists latently lifelong after infection. CMV reactivation that occurs periodically can cause disease in target organs including the eye, not only in immunosuppressed, but also in immunocompetent people. Due to its immunosuppressive properties, persistent CMV is involved in the pathogenesis of diverse diseases. The aim was to study the features of antibody formation against six individual CMV proteins and to conduct a correlation analysis with parameters of peripheral blood lymphocyte profile in patients with anterior uveitis of varying severity (without hypopion-mild course, with hypopion-more severe course). *Materials and methods.* 36 patients with anterior uveitis were examined. Group I consisted of 20 patients without hypopion, group II — 16 people with hypopion. No characteristic features of CMV anterior uveitis (elevated intraocular pressure, stromal iris atrophy) were found. Blood serum anti-CMV IgG antibodies (markers of chronic infection) were measured by ELISA, antibodies against individual recombinant CMV antigens were assessed by Line-Immunoassay specific to the main non-structural immediate early protein (IE), DNA-binding phosphoprotein p52, phosphoproteins of the tegument p150, p65, p28, GB-AD envelope glycoprotein. Lymphocyte subset composition was studied by flow cytometry: T-lymphocytes ($CD3^+$), T-helper cells ($CD3^+CD4^+CD8^-$), T-cytotoxic ($CD3^+CD4^-CD8^+$), T-double-positive ($CD3^+CD4^+CD8^+$), natural killers ($CD16^+CD56^+$), B-lymphocytes ($CD19^+$). Statistical analysis was performed using StatTech v. 3.0.2 program (Stattech LLC, Russia). *Results.* In mild anterior uveitis, there was observed a significantly increased percentage of $CD16^+CD56^+$ and a decreased absolute number of $CD3^+CD8^+$ compared with anterior uveitis of a more severe course. Only in the group of patients with hypopion (more severe course) there was a direct significant correlation between level of antibodies against IE, p65, p28 antigens and percentage of double-positive cells ($CD3^+CD4^+CD8^+$) as well as an negative significant relationship between the level of antibodies against IE, p65 and p52 antigens and $CD19^+$ lymphocytes. *Conclusion.* The data obtained are consistent with few reports on the role of double-positive lymphocytes in the pathogenesis of severe forms of some viral diseases. Further studies are needed to assess an effect of individual viral antigens on $CD3^+CD4^+CD8^+$ level in patients with chronic CMV infection to confirm the role of double-positive lymphocytes in the pathogenesis of a more severe course of anterior uveitis.

***Key words:*** *CMV antigens, lymphocyte subpopulations, double positive lymphocytes, anterior uveitis, line-immunoassay, hypopion.*

## Введение

Увеиты — заболевания сосудистой оболочки глаза, различающиеся по этиологии (инфекционные, неинфекционные), локализации (передние, периферические, задние, генерализованные), активности и тяжести. При переднем увеите (ПУ) интраокулярное воспаление локализуется в радужке и цилиарном теле. Одним из показателей тяжести ПУ является наличие в передней камере глаза клеточного экссудата — гипопиона, состоящего в основном из лейкоцитов.

Вирусы герпеса человека (ВГЧ), в частности цитомегаловирус (CMV), играют важную роль в этиологической структуре инфекционных ПУ, причем преобладают увеиты, вызванные не первичной инфекцией, а реактивацией пожизненно персистирующего в организме вируса [6].

Устанавливающаяся после первичного заражения пожизненная персистенция ВГЧ в клетках инфицированного хозяина — результат сложных взаимоотношений между иммунной системой человека и вирусом: с одной стороны, она связана со способностью вируса уклоняться от иммунного надзора хозяина, а с другой, с возможностью иммунной системы ограничивать литическую фазу инфекции [14].

CMV — самый крупный из вирусов герпеса человека, известно более 200 разных белков, участвующих в его жизненном цикле. Наиболее активно изучаются предранние белки, инициирующие литическую фазу инфекции, фосфопротеины тегумента (аморфного белкового слоя, расположенного между нуклеокапсидом и наружной оболочкой-суперкапсидом), участвующие в разных стадиях репликативного цикла, гликопротеины суперкапсида, облегчающие проникновение вируса во все типы клеток и его межклеточное распространение [13].

Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) у иммунокомпетентных лиц характеризуется динамичным взаимодействием вируса с иммунной системой хозяина на протяжении всей жизни, при этом иммунная система, особенно Т-лимфоциты, сдерживают репликацию вируса и развитие заболевания, но не элиминируют вирус и не предотвращают его передачу другому человеку [14, 15].

Проведенное Vescovini R. и соавт. [15] с интервалом в 5 лет обследование здоровых доноров показало достоверное увеличение уровня IgG-антител к CMV и количества специфических $CD8^+$ клеток памяти. Авторы полагают, что даже при отсутствии клинических признаков заболевания CMV модулирует состав иммунокомпетентных клеток за счет увеличения специфических клеток памяти.

Оппортунистический характер ЦМВИ проявляется в склонности к реактивации под влиянием различных экзо- и эндогенных факторов, в частности заболеваний другой этиологии, не только в условиях иммуносупрессии, но и у иммунокомпетентных лиц.

В последнее время обсуждается роль CMV в патогенезе неинфекционных увеитов.

Длительное время напряженность клеточного и гуморального иммунитета к CMV исследовали с использованием лизатов инфицированных клеток или смеси разных вирусных белков. Sylwester A.W. и соавт. [14] изучили иммуногенность пептидов, кодируемых 213 открытыми рамками считывания (ОРС) CMV, и выявили, что продукты 151 ОРС были иммуногенными для $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток. Причем у серопозитивных людей общий ответ популяции CMV-специфичных Т-лимфоцитов формировал приблизительно 10% $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток памяти периферической крови. Проанализировав литературу, авторы заключили, что у здоровых серопозитивных людей частота выявления CMV-специфичных $CD4^+$ и/или $CD8^+$Т-лимфоцитов значительно превышала частоту, обнаруживаемую при инфицировании такими распространенными вирусами, как вирусы кори, эпидемического паротита, гриппа, аденовирусами, поксвирусами и даже другими вирусами герпеса человека (вирус простого герпеса, вирус варицелла зостер).

Активное участие индивидуальных белков CMV в репликации вируса, их высокая иммуногенность вызывают интерес к роли каждого из них в иммунопатогенезе заболеваний разной этиологии.

По данным Kern F. и соавт. [9], у 40 здоровых серопозитивных к CMV доноров частота специфического ответа $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов периферической крови на иммунодоминантный антиген (АГ) p65 различалась: у 63% выявлен специфический ответ $CD4^+$ Т-лимфоцитов, а у 83% — $CD8^+$ Т-лимфоцитов.

Цель настоящего исследования — изучить особенности антителообразования к шести индивидуальным белкам CMV и провести корреляционный анализ с показателями субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с ПУ, протекающими с гипопионом и без него.

## Материалы и методы

36 пациентов с ПУ по результатам офтальмологического обследования разделили на 2 группы: 1 группа — ПУ без гипопиона (20 пациентов, средний возраст 42,9±14,6 год), 2 группа — ПУ с гипопионом (16 пациентов, средний возраст 41,6±13,9 год). Преобладали пациенты с увеитами, вызванными вирусом простого герпеса, реже — с ревматоидными увеитами. У всех 36 пациентов отсутствовали клинические симптомы, патогномоничные для ПУ ЦМВ-этиологии. Материалом для иммунологических исследований послужили образцы сывороток крови.

*Иммуноферментный анализ (ИФА).* При первом обращении у пациентов брали кровь из локтевой вены, сыворотку крови (СК) разливали на аликвоты, хранили до исследования при Т –20°С. СК исследовали в ИФА на наличие IgM- и IgG-антител к структурным поздним антигенам CMV (серологические маркеры первичной и хронической ЦМВИ соответственно). Использовали наборы реагентов «ВектоЦМВ-IgM» и «ВектоЦМВ-IgG» (Вектор-Бест, Россия). IgG-антитела к основному предраннему неструктурному белку вируса-IE (маркеры реактивации хронической ЦМВИ) исследовали с тест-системой «БиоСет-актив-ЦМВ (Биосервис, Россия). ИФА проводили на автоматическом анализаторе «Лазурит» (США) в соответствии с инструкцией производителя тест-систем. Результат ИФА учитывали по разнице оптической плотности (ΔОП) исследуемой и контрольной отрицательной сыворотки.

*Линейный иммуноанализ (ЛИА).* IgG-антитела в СК к индивидуальным рекомбинантным АГ CMV определяли методом линейного иммуно-

анализа (ЛИА) одновременно с постановкой ИФА. Рекомбинантные АГ CMV были получены в НИИВС им. И.И. Мечникова и содержали только высокоспецифичные для CMV белковые фрагменты вирусных антигенов (р): основной неструктурный предранний белок IE (IE), неструктурный предранний ДНК-связывающий белок р52 (р52), иммунодоминантные белковые фрагменты фосфопротеинов тегумента р150, р65, р28 и гликопротеина оболочки GB-AD [3].

Рекомбинантные АГ IE, р65, р160, р52, р28, AG-BD сорбировали на нитроцеллюлозных стрипах в виде индивидуальных линий. Отрицательным контрольным антигеном служила β-галактозидаза *E. coli*, для контроля правильности проведения реакции использовали иммунную сыворотку к IgG-человека. Комплекс «антитело–АГ» выявляли с помощью конъюгата моноклональных антител мыши к IgG-человека, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Результаты оценивали визуально по интенсивности окраски линий в месте нанесения каждого антигена в сравнении с положительным и отрицательным контролем и выражали в условных единицах, «плюсах» (+). Отсутствие окрашивания линии учитывали как отрицательный результат (–); очень слабое окрашивание — сомнительный результат (±); слабое окрашивание — слабоположительный результат (1+); умеренное окрашивание — положительный результат (2+); интенсивное окрашивание — сильноположительный результат (3+) [3].

*Проточная цитометрия.* Методом проточной цитометрии в цельной крови определяли относительное (%) и абсолютное содержание (а.с.) субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD8^-$), Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD4^-CD8^+$), дубль-позитивных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^+$ $CD8^+$), NK-клеток ($CD16^+CD56^+$), В-лимфоцитов ($CD19^+$), рассчитывали иммунорегуляторный индекс $CD4^+/CD8^+$ (ИРИ). Кровь брали в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом KSEDTA. Состав лимфоцитов оценивали методом лазерной проточной цитофлуориметрии (цитометр BD FACSCantoll, США). Содержание субпопуляций определяли в программе Canto (Becton Dickinson, США) с выделением региона по общей популяции, экспрессирующей $CD45^+$ антиген, и по гранулярности клеток ($CD45^+$PerCP-Cy5*/SSC) при помощи меченных флуорохромами антител к $CD3^+$ (FITC), $CD4^+$(PE-Cy7*), $CD8^+$(APC-CY7*), позволяющих дифференцировать клетки: Т-лимфоциты ($CD3^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD8^-$), Т-цитотоксические ($CD3^+$ $CD4^-CD8^+$), Т-«дубль-позитивные» ($CD3^+CD4^+$ $CD8^+$), натуральные киллеры ($CD16^+CD56^+$), В-лимфоциты ($CD19^+$), иммунорегуляторный индекс ($CD4^+/CD8^+$).

*Статистический анализ.* Использовали программу StatTech v. 3.0.2 (разработчик — ООО «Статтех», Россия).

Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова (при числе исследуемых более 50). Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_1$–$Q_3$).

Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий, выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Направление и теснота корреляционной связи между двумя количественными показателями оценивались с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (при распределении показателей, отличном от нормального).

Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывалась с помощью метода линейной регрессии.

Качественную оценку тесноты связи двух показателей оценивали по значению коэффициента корреляции (r) с помощью шкалы Чеддока: слабая — $0,1 < r < 0,3$; умеренная — $0,3 \le r < 0,5$; заметная — $0,5 \le r < 0,7$; высокая — $0,7 \le r < 0,9$; весьма высокая — $0,9 \le r < 1,0$. Направление связи: прямая (+) и обратная (–). Определяли также достоверность выявленного коэффициента корреляции ($p < 0,05$).

## Результаты

*Серологический анализ (ИФА).* IgG-антитела к поздним структурным антигенам CMV выявили у 36 (100%) пациентов обеих групп, что свидетельствовало о наличии у них хронической ЦМВ-инфекции (ХЦМВИ). Уровни IgG-антител к пулу поздних антигенов у отдельных больных в обеих группах колебались от 0,9 до > 3,5 ΔОП, средние показатели в обеих группах существенно не отличались ($p > 0,05$). Слабоположительные серологические маркеры реактивации ХЦМВИ (IgG-антитела к IE-антигену) обнаружены у 3 из 20 (15%) пациентов 1 группы и у 2 из 16 (12,5%) пациентов 2 группы ($p > 0,05$).

*Продукция IgG-антител к индивидуальным рекомбинантным АГ CMV у пациентов обеих групп (ЛИА).* Частота выявления и средние уровни (медиана) IgG-антител к каждому из исследованных индивидуальных АГ CMV в обеих группах также достоверно не отличалась ($p > 0,05$) (табл. 1 и 2).

*Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов 1 и 2 групп.* Обнаружено статистически значимое снижение абсолютного количества Т-цитотоксических клеток $CD3^+CD8^+$ ($p = 0,033$) и тенденция к снижению их процентного содержания ($p = 0,059$), достоверное повышение процентного содержания натуральных киллеров $CD16^+CD56^+$ ($p = 0,023$), повышение регуляторного индекса ($p = 0,033$) в группе 1 (ПУ без гипопиона) по сравнению с группой 2 (ПУ с гипопионом) (табл. 3).

*Корреляционный анализ* абсолютного и относительного содержания различных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови с уровнем антител к отдельным рекомбинантным АГ CMV выявил некоторые отличия в группе пациентов с ПУ без гипопиона и с его наличием (табл. 4).

*В группе 1 у пациентов с ПУ без гипопиона* выявлена умеренная прямая достоверная ($r = 0,472$; $p = 0,036$) корреляционная связь между уровнем антител к IE-антигену CMV и абсолютным количеством $CD45^+$-лимфоцитов и тенденция

**Таблица 1. Частота выявления IgG-антител (интенсивность окрашивания линии 1+, 2+, 3+) к рекомбинантным вирусным антигенам у CMV-серопозитивных пациентов с передними увеитами без и с наличием гипопиона (линейный иммуноанализ)**

Table 1. Detection rate of IgG antibodies (bands 1+, 2+, 3+) against CMV recombinant antigens in CMV-seropositive patients with anterior uveitis without and with hypopion (Line Immunoassay)

| **Передний увеит** Anterior uveitis | **Всего обследовано** Total examined | **Антигены ЦМВ** CMV antigens | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **IE** n (%)* | **p150** n (%) | **p52** n (%) | **p65** n (%) | **p28** n (%) | **GB-AD** n (%) |
| **Без гипопиона** Without hypopion | 20 | 3 (15) | 18 (90) | 11 (55) | 17 (85) | 15 (75) | 7 (35) |
| **С гипопионом** With hypopion | 16 | 2 (12,5) | 14 (87,5) | 10 (62,5) | 15 (94) | 11 (68,8) | 9 (56) |
| **p** | | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 | > 0,05 |

**Примечание.** *n (%) — число пациентов (%), серопозитивных к данному рекомбинантному антигену; ** $p < 0,05$ — достоверность отличия показателей между двумя группами ПУ.

Note. n (%) — number (%) of patients seropositive for specific recombinant antigen; **$p < 0.05$ — significant inter-group differences in parameters.

**Таблица 2. Средний уровень антител (Me) к рекомбинантным антигенам CMV в группах пациентов с передними увеитами без (I) и с наличием гипопиона (II) (линейный иммуноанализ)**

Table 2. Average level of antibodies (Me) against recombinant CMV antigens in groups of patients with anterior uveitis without (I) and with hypopyon (II) (Line Immunoassay)

| **Антигены ЦМВ** CMV-antigen | **Группа передних увеитов** Group of anterior uveitis | **n*** ** | **Me**** ** | **$Q_1$–$Q_3$***** ** | **p****** ** |
|---|---|---|---|---|---|
| **IE** | I* | 20 | 0,0 | 0,0–0,5 | 0,840 |
| | II****** | 16 | 0,0 | 0,0–0,1 | |
| **p150** | I | 20 | 2,0 | 1,0–2,0 | 0,944 |
| | II | 16 | 2,0 | 1,0–2,0 | |
| **p52** | I | 20 | 1,0 | 0,0–1,2 | 0,764 |
| | II | 16 | 1,0 | 0,0–1,2 | |
| **p65** | I | 19 | 2,0 | 1,0–2,0 | 0,489 |
| | II | 16 | 1,0 | 1,0–2,0 | |
| **GB-AD** | I | 20 | 0,5 | 0,4–1,0 | 0,273 |
| | II | 16 | 1,0 | 0,5–1,0 | |
| **p28** | I | 20 | 1,0 | 0,9–2,0 | 0,252 |
| | II | 16 | 1,0 | 0,4–1,0 | |

**Примечание.** *I — группа пациентов с передними увеитами без гипопиона; **II — группа увеитов с передними увеитами с гипопионом; ***n — число пациентов; ****Me (медиана) — средний уровень антител к рекомбинантному антигену; *****$Q_1$–$Q_3$ — нижний и верхний квартиль; ******$p < 0,05$ — статистически значимое отличие.

Note. *I — anterior uveitis without hypopyon; **II — anterior uveitis with hypopyon ***n — number of patients; ****Me (median) — average level of antibodies specific to recombinant antigen; *****$Q_1$–$Q_3$ — lower and upper quartiles; ******$p < 0.05$ — significant difference between I and II groups of anterior uveitis

(p = 0,055) к умеренной прямой (r = 0,435) корреляционной связи между уровнем антител к IE-антигену CMV и абсолютным количеством CD19. Таким образом, показано, что у пациентов с ПУ без гипопиона реактивация CMV сопровождается повышением общего количества лимфоцитов и тенденцией к повышению числа CD19 В-лимфоцитов (табл. 4).

Корреляционный анализ выявил также достоверную умеренную прямую связь между уровнем антител к АГ CMV p65 и абсолютным количеством цитотоксических $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов (r = 0,458; p = 0,049), а также достоверную умеренную обратную связь между уровнем антител к p65 и процентным содержанием $CD16^+CD56^+$(r = –0,478; p = 0,038). Повышение уровня антител к p65 достоверно коррелировало с повышением абсолютного количества цитотоксических Т-лимфоцитов и снижением процентного содержания натуральных киллеров. Также отмечена умеренная достоверная обратная связь между уровнем антител к GB-AD и процентным содержанием натуральных киллеров (r = –0,499) (табл. 3).

Реакция на увеличение уровня антител к основному иммунодоминантному белку тегумента p65 и белку оболочки GB-AD заключалась в достоверном умеренном снижении процентного содержания натуральных киллеров.

*Во 2 группе (ПУ с гипопионом)* выявлена достоверная заметная прямая корреляционная связь между процентным содержанием дубль-позитивных лимфоцитов ($CD3^+CD4^+CD8^+$) и уровнем антител к предраннему (IE) антигену CMV (r = 0,566, p = 0,022); абсолютным числом $CD3^+CD4^+CD8^+$-лимфоцитов и уровнем антител к белку тегумента p65 (r = 0,551, p = 0,027), а также процентным содержанием и абсолютным чис-

**Таблица 3. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с передними увеитами без (I) и с наличием гипопиона (II)**

Table 3. Peripheral blood lymphocyte subset profile in patients with anterior uveitis without (I) and with hypopion (II)

| Показатель* Index | Группа Group | M±SD/Me** | 95% ДИ/$Q_1$–Q*** | Обследовано человек Persons examined | P**** |
|---|---|---|---|---|---|
| $CD3^+$, % | I | 74,5 | 67,8–76,2 | 20 | 0,911 |
| | II | 73,0 | 69,5–76,5 | 16 | |
| $CD3^+$, абс.\|abs. | I | 1488,3±479,7 | 1263,8–1712,8 | 20 | 0,185 |
| | II | 1799,3±879,6 | 1330,5–2268,0 | 16 | |
| $CD3^+CD8^+$, % | I | 23,3±5,8 | 20,5–26,0 | 20 | 0,059 |
| | II | 27,3±6,4 | 23,8–30,7 | 16 | |
| $CD3^+CD8^+$, абс.\|abs. | I | ↓474,3 | 346,7–556,0 | 20 | 0,033**** |
| | II | 647,5 | 394,2–765,0 | 16 | |
| $CD3^+CD4^+$, % | I | 48,2±8,0 | 44,4–51,9 | 20 | 0,129 |
| | II | 44,2±7,2 | 40,3–48,0 | 16 | |
| $CD3^+CD4^+$, абс.\|abs. | I | 1007,3±413,8 | 813,6–1200,9 | 20 | 0,523 |
| | II | 1107,5±519,7 | 830,6–1384,4 | 16 | |
| $CD3^+CD4^+CD8^+$, % | I | 0,6 | 0,5–1,0 | 20 | 0,143 |
| | II | 1,0 | 0,8–1,3 | 16 | |
| $CD3^+CD4^+CD8^+$, абс.\|abs. | I | 12,8 | 7,1–24,2 | 20 | 0,077 |
| | II | 18,5 | 14,0–31,0 | 16 | |
| $CD16^+CD56^+$, % | I | ↑13,5 | 10,8–15,1 | 20 | 0,023**** |
| | II | 7,8 | 6,9–10,3 | 16 | |
| $CD16^+CD56^+$, абс.\|abs. | I | 223,3 | 180,7–357,0 | 20 | 0,239 |
| | II | 188,0 | 160,0–254,3 | 16 | |
| $CD19^+$, % | I | 14,0±7,0 | 10,8–17,3 | 20 | 0,145 |
| | II | 17,6±7,3 | 13,7–21,5 | 16 | |
| $CD19^+$, абс.\|abs. | I | 257,5 | 157,2–385,2 | 20 | 0,092 |
| | II | 393,5 | 246,5–611,8 | 16 | |
| $CD45^+$, абс.\|abs. | I | 2069,3±695,6 | 1743,7–2394,9 | 20 | 0,189 |
| | II | 2457,0±1034,4 | 1905,8–3008,2 | 16 | |
| CD4/CD8, абс.\|abs. | I | ↑2,2 | 1,7–2,6 | 20 | 0,033**** |
| | II | 1,6 | 1,4–2,2 | 16 | |

**Примечание.** * — субпопуляции лимфоцитов; **M±SD — среднее арифметическое±стандартное отклонение/Me — медиана; ***$Q_1$–$Q_3$ — нижний и верхний квартиль; ****p < 0,05 — статистически значимые различия показателей между I и II группами.

Note. * — lymphocyte subsets; M±SD — arithmetic mean±standard deviation/Me — median; ***$Q_1$–$Q_3$ — lower and upper quartiles; **** p < 0.05 — significant difference between I and II groups of anterior uveitis.

лом $CD3^+CD4^+CD8^+$ и уровнем антител к белку тегумента p28 (r = 0,670, p = 0,005; r = 0,563, p = 0,023, соответственно) (табл. 4).

В этой группе отмечена также достоверная заметная обратная корреляция между процентным содержанием $CD19^+$ В-лимфоцитов и уровнем антител к трем рекомбинантным АГ CMV: IE (r = –0,533, p = 0,033), p52 (r = –0,501 p = 0,048), p65 (r = 0,564, p = 0,023) (табл. 3)

## Обсуждение

Цитомегаловирус — самый крупный из вирусов герпеса человека, вирион которого состоит из внешней мембранозной оболочки (суперкапсида), белкового слоя, называемого тегументом, и икосаэдрического капсида, который содержит сжатый, большой (> 240 кб) геном ДНК. Попав в организм, CMV вызывает пожизненную инфекцию, реактивации которой способствуют многочисленные экзо- и эндогенные факторы, в первую очередь — иммуносупрессия.

Передний увеит — воспаление переднего отрезка увеального тракта глаза (радужки, цилиарного тела) — вызывается как инфекционными, так и неинфекционными факторами. Доказана этиологическая роль CMV при острых (протекающих с глаукомо-циклитическими кризами или с секторальной атрофией радужки) и хронических формах ПУ не только в условиях иммуносупрессии, но и у иммунокомпетентных людей [6].

Среди обследованных нами пациентов типичной для CMV клинической картины ПУ не выявлено ни в одном случае, хотя все 36 (100%) пациентов были хронически инфицированы ЦМВ. Субклинические серологические маркеры реактивации CMV (IgG-антитела к IE-антигену) обнаружены у 5 (11%) из них.

Накоплено много данных, свидетельствующих о ведущей роли Т-лимфоцитов в ограничении реактивации персистирующего ЦМВ [8, 14]. Мы провели анализ субпопуляционного состава циркулирующих лимфоцитов у пациентов с ПУ в зависимости от тяжести клинического течения и от специфического гуморального ответа к 6 индивидуальным антигенам CMV.

Общий анализ среднего уровня отдельных субпопуляций лимфоцитов выявил достоверное отличие между более легким (ПУ без гипопиона) и более тяжелым течением ПУ (с гипопионом): ПУ без гипопиона характеризовался

**Таблица 4. Статистически значимые корреляционные связи между уровнем антител к индивидуальным антигенам CMV и субпопуляциями лимфоцитов периферической крови у пациентов с передними увеитами без и с наличием гипопиона**

Table 4. Significant correlations between level of antibodies specific to individual CMV antigens and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with anterior uveitis without and with hypopion

| **Уровни антител к антигенам CMV** Antibody levels to CMV antigens | **Группа 1. Передние увеиты без гипопиона** Group I. Anterior uveitis without hypopion | | **Группа 2. Передние увеиты с гипопионом** Group II. Anterior uveitis with hypopion | |
|---|---|---|---|---|
| | **Прямая умеренная связь** Direct moderate correlation | **Обратная умеренная связь** Inverse moderate correlation | **Прямая заметная связь** Direct significant correlation | **Обратная заметная связь** Inverse significant correlation |
| **IE** | $CD45^+$ (абс.\|abs.)) r = 0,472 p = 0,036 | | $CD3^+CD4^+CD8^+$ (%) r = 0,566 p = 0,022 | $CD19^+$ (%) r = –0,533 p = 0,033 |
| **p52** | | | | $CD19^+$ (%) r = –0,501 p = 0,048 |
| **p65** | $CD3^+CD8^+$(абс.\|abs.) r = 0,458 p = 0,049 | $CD16^+CD56^+$ (%) r = –0,478 p = 0,038 | $CD3^+CD4^+CD8^+$(абс.\|abs.) r = 0,551 p = 0,027 | $CD19^+$ (%) r = –0,564 p = 0,023 |
| **GB-AD** | | $CD16^+CD56^+$ (%) r = –0,499 p = 0,025 | | |
| **p28** | | | $CD3^+CD4^+CD8^+$ (%) r = 0,670 p = 0,005 $CD3^+CD4^+CD8^+$(абс.\|abs.) r = 0,563 p = 0,023 | |

**Примечание.** абс. — абсолютное количество лимфоцитов; % — процентное содержание лимфоцитов; r — коэффициент корреляции; p < 0,05 статистически значимые значения для коэффициента корреляции.

Note. abs. — absolute count of lymphocytes; % — percentage of lymphocytes; r — correlation coefficient; p < 0.05 — significant correlation coefficient.

достоверно более высоким содержанием натуральных киллеров и более низким содержанием Т-цитотоксических клеток; в этой группе значимо повышался регуляторный индекс.

Анализ корреляционной связи между содержанием отдельных субпопуляций лимфоцитов и уровнем антител к индивидуальным антигенам CMV выявил ряд отличий между двумя группами. У пациентов с ПУ без гипопиона обнаружена достоверная умеренная обратная корреляционная связь между процентным содержанием натуральных киллеров ($CD16^+CD56^+$(%)) в периферической крови и уровнями IgG-антител к антигенам CMV: GB-AD ($p = 0,025$) и многофункциональному антигену p65 ($p = 0,038$). NK-лимфоциты осуществляют лизис клеток, инфицированных вирусами, и участвуют в регуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа [4, 10]. Усиление экспрессии некоторых антигенов является одним из факторов, индуцирующих выраженный иммунный ответ на них. Повышенная экспрессия доминантного иммуногенного антигена CMV p65, играющего важную роль в уклонении от иммунного надзора человека [9], и иммуногенного гликопротеина оболочки — GB-AD, облегчающего проникновение вируса во все типы клеток [13], коррелировало со снижением содержания в крови натуральных киллеров, участвующих в противовирусной защите клеток.

При повышении уровня антител к основному предраннему вирусному белку (маркеров реактивации CMV), повышалось абсолютное количество лимфоцитов в крови (прямая умеренная достоверная связь, $p = 0,036$) (табл. 3), что может свидетельствовать об усилении линии противовирусной защиты организма в начале реактивации ЦМВИ. При повышении уровня антител к p65, которое можно рассматривать как свидетельство усиления экспрессии вирусного антигена, играющего важную роль в репликации CMV, напрямую повышается уровень цитотоксических лимфоцитов $CD3^+CD8^+$ ($p = 0,049$).

По-видимому, у пациентов с ПУ без гипопиона ослабление врожденного иммунного ответа компенсировалось усилением специфического клеточного ответа за счет повышения количества Т-цитотоксических лимфоцитов, что ограничивало риск развития клинической CMV-симптоматики, но не исключало более длительного и торпидного течения увеита. Полученные данные согласуются с результатами Jackson S.E. и соавт. [8], показавшими, что у серопозитивных к CMV доноров специфичные к ЦМВ $CD8^+$ Т-лимфоциты обладают высокой антивирусной активностью и могут преодолевать имеющиеся у вируса механизмы уклонения от иммунного ответа хозяина.

Ряд исследователей полагает, что CMV даже в отсутствии клинических признаков заболевания модулирует состав иммунокомпетентных клеток, увеличивая количество клеток памяти, специфичных для CMV [9].

В группе II пациентов ПУ протекал тяжелее, с наличием клеточного экссудата в передней камере глаза — гипопиона. В этой группе выявлена достоверная заметная прямая корреляция продукции антител на несколько индивидуальных антигенов CMV и содержанием в крови (процентным и/или абсолютным) малой субпопуляции лимфоцитов — дубль-позитивных клеток ($CD3^+CD4^+CD8^+$): уровень антител к IE коррелировал с их процентным содержанием, к антигену p65 — с абсолютным количеством; к p28 — с их абсолютным числом и процентным содержанием. Фосфопротеин тегумента pp28, наряду с pp65, активно участвует на разных стадиях репликации ЦМВ, в частности при внутриклеточной передаче вируса и при выходе вириона из клетки [9,11].

Мембранные молекулы $CD4^+$ и $CD8^+$ являются основными рецепторами для Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов. Полагали, что одновременная экспрессия обеих молекул на мембране Т-лимфоцитов происходит только на этапе селекции в тимусе. Дубль-позитивные $CD3^+CD4^+CD8^+$ Т-лимфоциты у человека впервые обнаружили Blue M.L. и др. в 1986 г. [5], и первоначально их появление в периферической крови связывали с преждевременным выходом незрелых лимфоцитов из тимуса [2, 14].

В настоящее время считают, что субпопуляция дубль-позитивных лимфоцитов образована высокодифференцированными клетками памяти. $CD3^+CD4^+CD8^+$-клетки присутствуют в периферической крови у 1–3% практически здоровых людей, встречаются при аутоиммунных и хронических инфекционных болезнях [15]. Их количество постепенно увеличивается с возрастом, особенно после 65 лет. При хронических вирусных инфекциях они имеют фенотип эффекторных клеток памяти и проявляют антигенную специфичность [16]. Их уровень в крови может повышаться у лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, вирусами герпеса человека 6 типа, лимфоцитарного хориоменингита, Т-клеточного лейкоза человека и др. [17].

Если роль Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток в иммунопатогенезе ЦМВИ активно изучалась [14], то функциональное значение $CD3^+CD4^+CD8^+$-клеток не ясно, хотя не исключается их важное участие в адаптивном иммунном ответе на разные инфекционные агенты. Отмечается их гетерогенность. Часть исследователей считает, что источником $CD3^+CD4^+CD8^+$-лимфоцитов являются $CD4^+$ Т-клетки [12], другие — что $CD8^+$-лимфоциты [14, 16, 17].

По данным Zhang H. и соавт. [17], у пациентов с хантавирусной геморрагической лихорадкой с почечным синдромом дубль-позитивные Т-клетки по своим характеристикам сходны с цитотоксическими Т-лимфоцитами и обладают антивирусными свойствами.

Giraldo N.A. и соавт. [7] обнаружили в крови пациентов с хронической болезнью Шагаса (вызванной простейшим вида *Trypanosoma cruzi*) увеличение относительного (%) содержания дубль-позитивных лимфоцитов по сравнению со здоровыми лицами, а также наличие в сердечной мышце больных с кардиомиопатией антигенспецифических $CD3^+CD4^+CD8^+$-клеток.

Показано, что увеличение количества $CD3^+CD4^+CD8^+$ дубль-позитивных Т-клеток в периферической крови имеет важное патогенетическое значение как фактор риска возникновения тяжелого (вплоть до летального исхода) осложнения лихорадки Денге — плазмореи [16]. По мнению авторов, $CD3^+CD4^+CD8^+$ дубль-позитивные Т-клетки относятся к эффекторным Т-клеткам, которые по транскриптому ближе к $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитам, чем к $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитам [16]. Противоречива и оценка функций дубль-позитивных клеток крови: от цитотоксической до супрессивной [12].

Несмотря на то, что механизмы развития гипопиона при ПУ и плазмореи при лихорадке Денге во многом различаются, оба симптома начинаются с нарушения проницаемости сосудов и характеризуют более тяжелую форму заболевания. При лихорадке Денге с плазмореей отмечено увеличение количества дубль-положительных лимфоцитов в крови по сравнению с легкой формой болезни. При ПУ с гипопионом отмечено прямое влияние нескольких антигенов CMV на уровень $CD3^+CD4^+CD8^+$ Т-лимфоцитов в отличие от более легких форм ПУ без гипопиона.

Одно из первых исследований роли $CD3^+CD4^+CD8^+$-лимфоцитов в патогенезе тяжелой патологии сетчатки глаза — возрастной макулярной дегенерации (ВМД) показало повышение абсолютного и относительного количества этих клеток и высокую частоту их выявления в крови пациентов с начальной и промежуточной стадиями ВМД, что позволило авторам предположить их возможную роль в патогенезе ВМД [1]. Следует отметить, что изучение роли дубль-позитивных лимфоцитов в офтальмопатологии только начинается.

## Заключение

Несмотря на то, что наши результаты получены на ограниченном материале, они позволили выявили корреляционные связи между показателями гуморального иммунного ответа на индивидуальные антигены CMV и отдельными показателями субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с передними увеитами в зависимости от тяжести течения заболевания. Из 6 исследованных АГ CMV наиболее иммунореактивными оказались предранний антиген (IE), инициирующий начало литического цикла, и иммунодоминантный белок p65, участвующий в разных стадиях репликативного цикла вируса и в осуществлении программы ускользания CMV от иммунного ответа человека. Обнаружена статистически значимая заметная корреляционная связь между дубль-позитивными $CD3^+CD4^+CD8^+$-клетками и $CD19^+$-лимфоцитами и антителообразованием к четырем антигенам CMV у пациентов с гипопионом: прямая связь между дубль-позитивными лимфоцитами и антигенами IE, p65 и p28, обратная — между $CD19^+$-лимфоцитами и антигенами IE, p52 и p65. Эти данные указывают на возможное влияние индивидуальных антигенов CMV на субпопуляционный состав лимфоцитов и иммунопатогенез передних увеитов. Полученные результаты показали перспективность выбранного направления исследований.

## Список литературы/References

1. Балацкая Н.В., Еремеева Е.А., Слепова О.С., Рябина М.В., Куликова И.Г., Сорожкина Е.С. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 5. С. 461–466. [Balatskaya N.V., Eremeeva E.A., Slepova O.S., Ryabina M.V., Kulikova I.G., Sorozhkina E.S. Peripheral blood subpopulation of lymphocytes of patients with age-related macular degeneration. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, vol. 17, no. 5, pp. 461–466. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466*
2. Лебедев М.Ю., Шолкина М.Н., Живцов О.П. Содержание дубль-позитивных $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов в периферической крови тяжелообожженных и больных с остеомиелитом // Фундаментальные исследования. 2013. № 12-1. С. 45–48. [Lebedev M.Y., Sholkina M.N., Zhivshov O.P. Content of double-positive $CD4^+CD8^+$ lymphocytes in peripheral blood of patients with severe burns and patients with osteitis. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research, 2013, no. 12, pp. 45–48. (In Russ.)*]
3. Нероев В.В., Кричевская Г.И., Алаторцева Г.И., Рябина М.В., Сарыгина А.П., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Лухверчик Л.Н. Особенности продукции IgG-антител к индивидуальным белкам цитомегаловируса при различных заболеваниях глаз (возрастной макулярной дегенерации и центральной серозной хориоретинопатии) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 530–538. [Neroev V.V., Krichevskaya G.I., Alatortseva G.I., Ryabina M.V., Sarygina A.P., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Lukhverchik L.N. Features of IgG-antibodies production to individual Cytomegalovirus proteins in various eye diseases (age-related macular degeneration and central serous chorioretinopathy). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 530–538. (in Russ)*] *doi: 10.15789/2220-7619-FOI-1424*

4. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология. 2009, Т. 11, № 2–3. С. 227–238. [Khaidukov S.V., Zuruchka A.V., Totolian Areg A., Chereshnev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values? As assayed by multi-colour cytometry. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2009, vol. 11, no. 2–3, pp. 227–238. (In Russ.)*]
5. Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Craig K.A., Schlossman S.F. Biosynthesis and surface expression of T8 by peripheral blood T4⁺ cells in vitro. *J. Immunol., 1986, vol. 137, no. 4, pp. 1202–1207.*
6. Chan N.S., Chee S.P., Caspers L., Bodaghi B. Clinical features of CMV-associated anterior uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm., 2018, vol. 26, no. 1, pp. 107–115. doi:10.1080/09273948.2017.1394471*
7. Giraldo N.A., Bolaños N.I., Cuellar A., Guzman F., Uribe A.M., Bedoya A., Olaya N., Cucunubá Z.M., Roa N., Rosas F., Velasco V., Puerta C.J., González J.M. Increased CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl. Trop. Dis., 2011, vol. 5, no. 8: e1294. doi: 10.1371/journal.pntd.0001294*
8. Jackson S.E., Mason G.M., Okecha G., Sissons J.G., Wills M.R. Diverse specificities, phenotypes, and antiviral activities of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells. *J. Virol., 2014, vol. 88, no. 18, pp. 10894–10908. doi: 10.1128/JVI.01477-14*
9. Kern F., Bunde T., Faulhaber N., Kiecker F., Khatamzas E., Rudawski I.M., Pruss A., Gratama J.W., Volkmer-Engert R., Ewert R., Reinke P., Volk H.D., Picker L.J. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J. Infect. Dis., 2002, vol. 185, no. 12, pp. 1709–1716. doi: 10.1086/340637*
10. Kucuksezer U.C., Aktas Cetin E., Esen F., Tahrali I., Akdeniz N., Gelmez M.Y., Deniz G. The role of natural killer cells in autoimmune diseases. *Front. Immunol., 2021, vol. 12: 622306. doi:10.3389/fimmu.2021.622306*
11. König P., Svrlanska A., Read C., Feichtinger S., Stamminger T. The autophagy-initiating protein kinase ULK1 phosphorylates human cytomegalovirus tegument protein pp28 and regulates efficient virus release. *J. Virol., 2021, vol. 95, no. 6: e02346–20. doi: 10.1128/JVI.02346-20*
12. Overgaard N.H., Jung J.W., Steptoe R.J., Wells J.W. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol., 2015, vol. 97, no. 1, pp. 31–38. doi: 10.1189/jlb.1RU0814-382*
13. Siddiqui S., Hackl S., Ghoddusi H., McIntosh M.R., Gomes A.C., Ho J., Reeves M.B., McLean G.R. IgA binds to the AD-2 epitope of glycoprotein B and neutralizes human cytomegalovirus. *Immunology, 2021, vol. 162, no. 3, pp. 314–327. doi: 10.1111/imm.13286*
14. Sylwester A.W., Mitchell B.L., Edgar J.B., Taormina C., Pelte C., Ruchti F., Sleath P.R., Grabstein K.H., Hosken N.A., Kern F., Nelson J.A., Picker L.J. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med., 2005, vol. 202, no. 5, pp. 673–685. doi: 10. 1084/jem.20050882*
15. Vescovini R., Telera A.R., Pedrazzoni M., Abbate B., Rossetti P., Verzicco I., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Calderaro A., Volpi R., Sansoni P., Fagnoni F.F. Impact of persistent cytomegalovirus infection on dynamic changes in human immune system profile. *PLoS One, 2016, vol. 11, no. 3: e0151965. doi: 10.1371/journal.pone.0151965*
16. Yu E.D., Wang H., da Silva Antunes R., Tian Y., Tippalagama R., Alahakoon S.U., Premawansa G., Wijewickrama A., Premawansa S., De Silva A.D., Frazier A., Grifoni A., Sette A., Weiskopf D. A population of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells associated with risk of plasma leakage in dengue viral infection. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 1: 90. doi: 10.3390/v14010090*
17. Zhang H., Wang Y., Ma Y., Tang K., Zhang C., Wang M., Zhang X., Xue M., Jia X., Hu H., Li N., Zhuang R., Jin B., Chen L., Zhang Y., Zhang Y. Increased CD4⁺CD8⁺ double positive T cells during hantaan virus infection. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 10: 2243. doi: 10.3390/v14102243*

**Авторы:**
**Кричевская Г.И.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;
**Балацкая Н.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;
**Алаторцева Г.И.**, к.б.н., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
**Сорожкина Е.С.**, научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия
**Ковалева Л. А.**, к.м.н., научный сотрудник отдела инфекционных и аллергических заболеваний глаз ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;
**Куликова И.Г.**, старший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;
**Доценко В.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
**Нестеренко Л.Н.**, к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
**Лухверчик Л.Н.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

**Authors:**
**Krichevskaya G.I.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;
**Balatskaya N.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Head of the Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;
**Alatortseva G.I.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
**Sorozhkina E.S.**, Researcher, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;
**Kovaleva L.A.**, PhD (Medicine), Researcher, Department of Infectious and Allergic Eye Diseases, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;
**Kulikova I.G.**, Senior Researcher, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;
**Dotsenko V.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
**Nesterenko L.N.**, PhD (Chemistry), Leading Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
**Lukhverchik L.N.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.04.2023
Принята к печати 21.06.2023

Received 26.04.2023
Accepted 21.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 709–722

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 709–722

# PROBIOTICS IN PREVENTION AND TREATMENT OF COVID-19: A SYSTEMATIC REVIEW OF CURRENT EVIDENCE

**S. SeyedAlinaghi[a], R. Shahidi[b], A. Afzalian[c], P. Paranjkhoo[d], K. Ghorbanzadeh[e], H. Mojdeganlou[f], A. Razi[c], P. Mojdeganlou[g], M. Dashti[h], A. Ghasemzadeh[h], S.N. Parikhani[c], A. Pashaei[i], A. Karimi[c], S. Ahmadi[c], E. Mehraeen[e], D. Hackett[j]**

[a] *Iranian Research Center for HIV/AIDS, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[b] *School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*
[c] *School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[d] *Turpanjian College of Health Sciences, American University of Armenia, Yerevan, Armenia*
[e] *Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran*
[f] *The Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, USA*
[g] *Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[h] *Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[i] *School of Nursing, University of British Columbia, Vancouver, Canada*
[j] *The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia*

**Abstract.** *Introduction.* Clinical evidence suggests that certain probiotics may help treat and prevent viral infections. To date, the effectiveness of probiotics in the alleviation of COVID-19 has not been established. The aim of this systematic review was to assess the role of probiotics in the prevention and treatment of COVID-19. *Materials and methods.* An extensive search of four electronic databases was performed which included Embase, Scopus, Web of Science, and PubMed from November 2019 to June 2022. After reviewing the references list of related articles additional studies were identified. A multiple combination of keywords validated by MESH were used to search the databases. Study selection was performed according to an inclusion and exclusion criteria. *Results.* Twenty-three articles met the study inclusion criteria. Six articles were conducted *in vitro* while the remaining studies were conducted in the human population (*in vivo*). The type of probiotic was defined in eighteen studies. There were two studies that used supplements (vitamins, herbals, minerals, etc.) in addition to probiotics. The largest sample size was 445 850 participants which were from a study that used an application-based survey. The majority of studies found that probiotics had a positive effect on the COVID-19 disease. The benefits included early remission of COVID-19 symptoms and a shorter duration of sickness (10 studies), lower mortality rates (3 studies), and decreased hospitalization and length of stay (3 studies). Six *in vitro* studies found that probiotics were beneficial against SARS-CoV-2 through antiviral effects. There were only two studies that found probiotics to be ineffective or caused negative effects when consumed in COVID-19 patients. *Conclusion.* Available evidence supports the antiviral role of probiotics on prevention and treatment of COVID-19. The antiviral potential of *Lactobacillus paracasei* metabolite PlnE and PlnF against SARS-CoV-2 may explain the effectiveness of probiotics on COVID-19.

***Key words:*** *COVID-19, SARS-CoV-2, 2019-nCoV, probiotics, treatment, prevention.*

**Адрес для переписки:**
Эсмаэйл Мехраин
5681761351, Иран, г. Халхал, Халхальский медицинский университет, кафедра медицинских информационных технологий.
Тел.: +98-45-32426801. Факс: +98-45-32422305.
E-mail: es.mehraeen@gmail.com

**Contacts:**
Esmaeil Mehraeen
5681761351, Iran, Khalkhal, Khalkhal University of Medical Sciences, Department of Health Information Technology.
Phone: +98-45-32426801. Fax: +98-45-32422305.
E-mail: es.mehraeen@gmail.com

**Для цитирования:**
СейедАлинаги С., Шахиди Р., Афзалян А., Паранджху П., Горбанзадех К., Мождеганлу Х., Рази А., Мождеганлу П., Дашти М., Гасемзаде А., Парихани С.Н., Пашай А., Карими А., Ахмади С., Мехраин Э., Хакетт Д. Пробиотики в профилактике и лечении COVID-19: систематический обзор современных данных // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 709–722. doi: 10.15789/2220-7619-PIP-2118

**Citation:**
SeyedAlinaghi S., Shahidi R., Afzalian A., Paranjkhoo P., Ghorbanzadeh K., Mojdeganlou H., Razi A., Mojdeganlou P., Dashti M., Ghasemzadeh A., Parikhani S.N., Pashaei A., Karimi A., Ahmadi S., Mehraeen E., Hackett D. Probiotics in prevention and treatment of COVID-19: a systematic review of current evidence // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 709–722. doi: 10.15789/2220-7619-PIP-2118



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PIP-2118

# ПРОБИОТИКИ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ COVID-19: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ДАННЫХ

**СейедАлинаги С.[1], Шахиди Р.[2], Афзалян А.[3], Паранджху П.[4], Горбанзадех К.[5], Мождеганлу Х.[6], Рази А.[3], Мождеганлу П.[7], Дашти М.[8], Гасемзаде А.[8], Парихани С.Н.[3], Пашай А.[9], Карими А.[3], Ахмади С.[3], Мехраин Э.[5], Хакетт Д.[10]**

[1] *Иранский исследовательский центр по ВИЧ/СПИДу, Иранский институт по снижению рискованного поведения, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран*
[2] *Медицинский факультет Бушерского университета медицинских наук, Бушер, Иран*
[3] *Медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран*
[4] *Турпанджянский колледж медицинских наук, Американский университет Армении, Ереван, Армения*
[5] *Халхальский медицинский университет, Халхал, Иран*
[6] *Университет Джона Хопкинса, Балтимор, Мэриленд, США*
[7] *Университет медицинских наук им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран*
[8] *Тебризский университет медицинских наук, Тебриз, Иран*
[9] *Факультет сестринского дела Университета Британскоу Колумбии, г. Ванкувер, Канада*
[10] *Школа медицинских наук, Сиднейский университет, Сидней, Новый Южный Уэльс, Австралия*

**Резюме.** *Введение.* Клинические данные свидетельствуют о том, что некоторые пробиотики могут быть полезны в лечении и профилактике вирусных инфекций. Однако эффективность пробиотиков при COVID-19 на сегодняшний день не установлена. Цель настоящего систематического обзора заключалась в оценке роли пробиотиков в профилактике и лечении COVID-19. *Материалы и методы.* Был проведен расширенный поиск информации по обозначенному выше вопросу в четырех электронных базах данных, включая Embase, Scopus, Web of Science и PubMed, во временном интервале с ноября 2019 г. по июнь 2022 г. После изучения списка соответствующих статей были определены дополнительные поисковые ограничения. Для поиска в базах данных использовалось несколько комбинаций ключевых слов, проверенных MESH. Отбор исследований осуществлялся в соответствии с критериями включения и исключения. *Результаты.* Двадцать три статьи соответствовали критериям включения в исследование. В шести статьях была информация об исследованиях, проведенных *in vitro*, в остальных — об исследованиях, проведенных у людей *(in vivo)*. Тип пробиотика был указан в восемнадцати исследованиях. В двух исследованиях в дополнение к пробиотикам использовались пищевые добавки (витамины, травы, минералы и т. д.). Самый большой размер выборки составил 445 850 участников, опрос которых проводился в мобильном приложении COVID Symptom Study. Большинство исследований показало, что пробиотики оказывают положительное влияние на течение COVID-19, что проявляется в начале ремиссии симптомов COVID-19 на ранних сроках заболевания и в более короткой продолжительности болезни (по данным 10 исследований), в более низких показателях смертности (3 исследования), а также в снижении числа госпитализаций и продолжительности пребывания в стационаре (3 исследования). Шесть исследований *in vitro* показали, что пробиотики были эффективны в отношении SARS-CoV-2 благодаря противовирусному действию. Только два исследования показали, что пробиотики при COVID-19 неэффективны или их применение приводят к негативным последствиям. *Выводы.* Имеющиеся данные подтверждают роль пробиотиков в профилактике и лечении COVID-19. Эффективность пробиотиков при COVID-19 может быть объяснена наличием противовирусного потенциала бактериоцинов PlnE и PlnF *Lactobacillus paracasei* в отношении SARS-CoV-2.

***Ключевые слова:*** *COVID-19, SARS-CoV-2, 2019-nCoV, пробиотики, лечение, профилактика.*

## Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) has rapidly spread from China around the world and is considered a global pandemic. As of early December 2021, 263 000 000 people across five continents have been infected by COVID-19 [15, 54]. This disease has emerged as a multifaceted, multisystem and multi-organ disorder ranging from nonspecific flu-like symptoms, to pneumonia, acute respiratory distress syndrome (ARDS), multiple organ failure and death [5, 36].

Supplementing with non-pharmacological substances such as probiotics and nutraceuticals has been suggested as a potential therapeutic option for COVID-19, due to evidence of an interference effect on the SARS-CoV-2 pathway [25]. Specifically, probiotics with anti-inflammatory or immunomodulatory properties may be the most effective for prevention or alleviation of COVID-19 symptoms [8]. In early February 2020, China's National Health Commission and National Administration (version 5) recommended the use of probiotics and gut microecological modulators in COVID-19 patients to maintain the balance of intestinal microecology [67].

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host [1]. Probiotics exert their beneficial effects through various mechanisms including manipulation and restoration of gut microbiota, enhancement

of intestinal barrier function, and competition with pathogens for adhesion to gut epithelium and nutrition, and suppression of opportunistic pathogens. Other potential mechanisms explaining how probiotics may promote beneficial effects include the production of antimicrobial substances, decrease in translocation of opportunistic organisms, activation of mucosal immunity, and modulation of the innate and adaptive immune response [66].

Although the rationale for using probiotics to treat COVID-19 comes from indirect evidence, it is mechanistically plausible that probiotics may help in the prevention of and/or alleviation of COVID-19 related symptoms and complications. Moreover, probiotics are readily available, easy to administer (oral administration), relatively safe and economical compared with antiviral drugs, immunomodulators or other strategies tested in COVID-19 [4]. There is clinical evidence showing that certain probiotics may help treat and prevent viral infections [67]. However, the role of probiotics in alleviation of the novel COVID-19 has not been established. The aim of this systematic review was to assess the role of probiotics in the prevention and treatment of COVID-19.

## Materials and methods

*Study objective and search strategy.* An extensive search of four electronic databases was performed which included Embase, Scopus, Web of Science, and PubMed from November 2019 to June 2022. After reviewing the references list of related articles additional studies were identified. A multiple combination of keywords validated by MESH was used as the search strategy. Only English and Persian studies were included in the search. The search strategy is presented in Table 1. This systematic review was conducted according to the recommendations outlined in the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [41].

*Inclusion/exclusion criteria.* Articles were eligible for inclusion if they met the following criteria: (1) randomized controlled trials, cross sectional, case series, case reports, and cohort studies; (2) examined the effect of a probiotic on outcomes related to immunity, immunological responses, or signs/symptoms/severity of COVID-19; (3) involved adult humans that were 18 years old or older; (4) experiment was conducted either *in vivo* or *in vitro*, and (5) published in English and Persian. Articles were excluded if they were non-original, review papers, commentaries, or editorials.

*Screening and selection.* A two-step method was performed to improve the study selection process. After removing duplicate articles, step-one was performed which involved screening of titles and abstracts of retrieved. For step-two the full-text of articles that were potentially eligible were assessed by two reviewers to confirm eligibility. Articles were compiled in an Endnote X9© (Thomson Reuters) file.

*Data extraction.* A standardised template was used by the researchers to complete data extraction. The information extracted included the first authors' name, type of study, date of study, study population, characteristics of participants, probiotic type, doses of probiotic, comparator group, effects of probiotic on cytokines and serum ingredients, and other relevant outcomes. Two independent researchers extracted and entered the information into the template.

## Results

The database search yielded 690 potential studies (after 649 duplicates were removed), and following the screening, a total of 23 studies met the eligibility criteria (Fig.). The description of the studies included is detailed in Table 2. Six articles were conducted *in vitro* while the remaining studies were conducted in the human population (*in vivo*). The type of probiotic was defined in eighteen studies. There were two studies that used supplements (vitamins, herbals, minerals, etc.) in addition to probiotics. The largest sample size was 445 850 participants which were from a study that used an application-based survey [34]. The smallest sample size of the included studies was 30 participants [59].

**Table 1. Search strategy keywords**

| Concepts | Search strategy |
|---|---|
| **Disease** | COVID-19 OR SARS-CoV-2 OR COVID-19 OR SARS-CoV-2 OR coronavirus disease 2019 OR Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 OR SARS CoV 2 OR 2019 Novel Coronavirus OR 2019-nCoV OR 2019 nCoV OR Coronavirus Disease-19 OR Coronavirus Disease 19 OR SARS Coronavirus 2 OR Wuhan Seafood Market Pneumonia Virus OR Wuhan Coronavirus OR Coronavirus disease 2 OR Coronavirus disease 2019 OR coronavirus infection 2019 OR COVID OR nCoV 2019 OR new coronavirus pneumonia OR Novel coronavirus OR SARSCoV2 OR severe acute respiratory syndrome 2 OR severe acute respiratory syndrome coronavirus 2019 infection OR severe acute respiratory syndrome CoV-2 infection OR 2019 new coronavirus OR coronavirus SARS-2 OR HCoV-19 OR Human coronavirus 2019 OR nCoV-2019 OR novel 2019 coronavirus OR SARS-2 (virus) OR SARS-2-CoV OR SARS-related coronavirus 2 OR SARS2 (virus) OR Severe acute respiratory coronavirus 2 OR Severe acute respiratory syndrome 2 OR Severe acute respiratory syndrome corona virus 2 OR Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2019 OR Severe acute respiratory syndrome coronoavirus 2 OR Severe acute respiratory syndrome coronvirus 2 OR Severe acute respiratory syndrome CoV-2 virus OR Severe acute respiratory syndrome related coronavirus 2 OR Severe acute respiratory syndrome virus 2 |
| **Variable** | Probiotics OR Prebiotics OR Probiotic OR Prebiotic OR probiotic agent OR prebiotic agent |

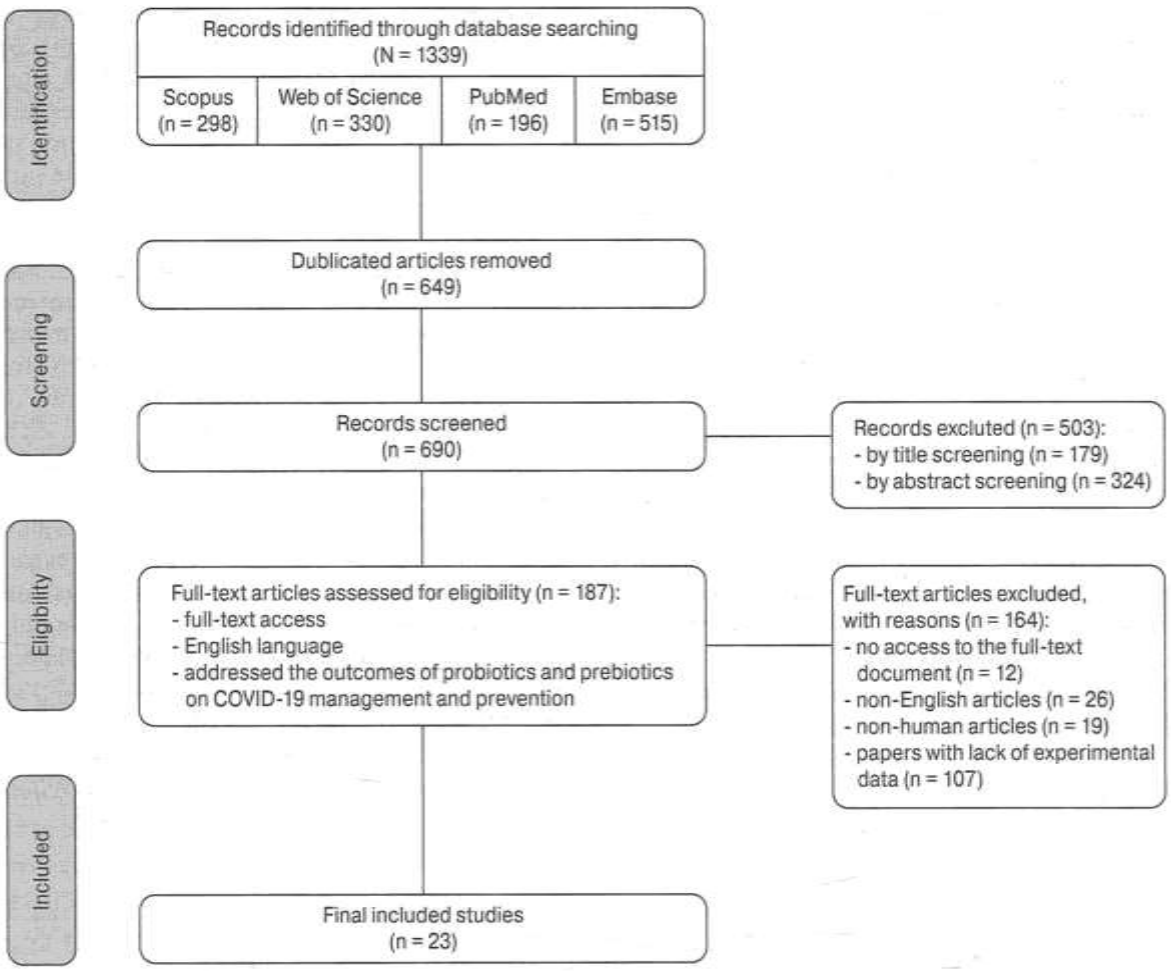


**Figure. PRISMA flow diagram of study retrieval process**

Most studies (n = 20) confirmed that probiotics were effective in COVID-19 illness. Ten studies found that consumption of probiotics led to early remission of COVID-19 symptoms and a shorter duration of sickness. Meskina et al. stated that probiotics helped patients' COVID-19 symptoms resolve faster [38]. In three studies, lower mortality was seen in patients who consumed probiotics.

Three studies reported that patients taking probiotics had decreased hospitalization and length of stay [9, 38, 67]. Two studies claimed that probiotic consumption is linked to earlier lung CT scan resolution in patients [31, 38]. According to Bozkurt et al., probiotic use is associated with lower mortality and earlier lung CT scan resolution [14] and other studies found probiotics helpful to resolve diarrhea.

Wang et al. reported that for COVID-19 patients that began taking probiotics, their COVID-19 test results became negative faster and diarrhea resolved sooner compared to patients that did not consume probiotics [62]. Six *in vitro* studies found some probiotics to be beneficial against SARS-CoV-2 through antiviral effects, preventing its replication or modulating ACE2 and inflammatory cytokines. Rather et al., reported that *L. plantarum* had a meaningfully beneficial effect on preventing SARS-CoV-2 replication [47]. Potentially this ability may be caused by plantarcin E and F. There were two studies that discussed COVID-19 reinfection. Li et al. claimed that probiotics can decrease secondary infection through immunity moderation [32]. The other study by Veterini et al. reported that two individuals in a non-probiotic group experienced reinfection, while no reinfection was seen in a group that consumed probiotics [59].

In contrast to the positive findings reported on consumption of probiotics, there were some studies which demonstrated that probiotics were ineffective or even had negative effects on the course of COVID-19 infection. According to Hegazy et al., probiotic yoghurt consumption in the 12 months preceding COVID-19 infection was linked to more severe disease [24]. Ivashkin et al. reported that the studied probiotic had no meaningful effect on the COVID-19 severity [21, 32]. Finally, Li et al. claimed that consumption of probiotics did not decrease IL-6 and length of hospitalization was higher in probiotic group [26].

**Table 2. Description of the findings reported in eligible studies**

| ID | First author | Country | Year of publication | Type of study | No. of participants | Participants characteristics | Probiotics | Dose | Comparators | Effects of probiotics | Outcome |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Barber M.S. [6] | USA | 2021 | Retrospective (chart review) | 30, mean age: 45.47±22.13 | Mild, Moderate | – | – | – | – | Patients who consumed probiotics, vitamins, and minerals experienced remission of mild and moderate symptoms |
| 2 | Bozkurt H. [14] | Turkey | 2021 | Retrospective | 44, Adults ≥ 18 years | Moderate, Severe | *Bifidobacterium* | 1 trillion CFU in 250 ml water (3 divided doses per day) | Anti-interleukin-1, Anti-interleukin-6, Antibiotics, Immune plasma | IL-6↓ | Probiotic consumption linked to earlier Lung CTscan resolution in patients. Length of hospitalization↓ Mortality↓ |
| 3 | D'Ettorre G. [16] | Italy | 2020 | Cohort | 70, 59±14.4 and 60.5±14.2 | Severe | *L. plantarum* DSM 32244, *L. acidophilus* DSM32241, *L. brevis* DSM 27961, *L. paracasei* DSM32243, *B. lactis* DSM 32246 and DSM 32247, *L. helveticus* DSM 32242, *Streptococcus thermoophilus* DSM 32345 | 2400 billion bacteria daily (3 divided doses per day) | COVID-19 medications was given to both probiotic and non-probiotic groups | – | Bacterial supplement had a meaningful beneficial effect on COVID-19 infection. Early resolve of symptoms (such as diarrhea) Mortality ↓ Eight times lower respiratory deterioration |
| 4 | Ezzat A. [17] | Egypt | 2022 | *In vitro* | – | – | Levans Lev9A (*Bacillus subtilis* 9A) LevanAE (*Pseudomonas aeruginosa*) levG (*Enterococcus faecalis*) Lev13M LevH | – | – | – | In this study LevAE Lev9A and Lev13A were found to have meaningful antiviral effects on coronavirus |
| 5 | Gutierrez-Castrellon P. [21] | Mexico | 2022 | RCT | 300, 18–60 years old | Mild, Moderate | *Pediococcus acidilactici* KABP021 + *Lactiplantibacillus plantarum* KABP022, KABP023, KAPB033 | – | Placebo | Specific IgM, IgG↑ hsCRP↓ Nasopharyngeal viral load↓ D-dimer↓ | Probiotics shortened duration of COVID-19 symptoms in patients and decreased the infiltrations in chest CT scan. Probable beneficial effect of probiotic occurs through effects on the immune system |
| 6 | Gutierrez-Castrellon P. [22] | Mexico | 2022 | RCT | 70 | – | *Lactiplantibacillus plantarum* CECT7484, CECT7485, CECT30292, *Pediococcus acidilactici* CECT7483 | $2 \times 10^9$ CFU daily (30 days) | Placebo | IFNα↑ IFNβ↑ SARS-CoV2-specific IgM↑, IgG↑ | Probiotic caused higher serum level of Interferons which is linked to increased IgM and IgG and early remission of some COVID-19 symptoms |
| 7 | Hegazy M. [24] | Egypt | 2022 | Cohort | 200 Mild: mean age = 37 Moderate: mean age = 45 | Mild, Moderate | – | – | – | Serum ferritin↑ | Probiotic yoghurt consumption during 12 months before the disease linked to more severe disease. Patients with no history of probiotic yoghurt intake experienced more gastrointestinal discomfort and diarrhea |

**Table 2. Description of the findings reported in eligible studies (continued)**

| ID | First author | Country | Year of publication | Type of study | No. of participants | Participants characteristics | Probiotics | Dose | Comparators | Effects of probiotics | Outcome |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | Ivashkin V. [26] | Russia | 2021 | RCT | 200<br>Probiotic group: 65 (59–71)<br>Control group: 64 (54–70) | – | *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* PDV1911, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* PDV 2301, *Bifidobacterium bifidum* PDV 0903, *Lacticaseibacillus rhamnosus* PDV 1705 | – | COVID-19 medications was given to both probiotic and non-probiotic groups | – | Probiotic had no meaningful effect on COVID-19 severity<br>Helpful for relieving diarrhea in COVID-19 patients. Probiotics beneficial to prevent nosocomial diarrhea in patients consuming one antibiotic |
| 9 | Ke E. [28] | China | 2020 | – | 800 | – | – | – | – | – | Probiotics beneficial to reduce duration of illness and resolve diarrhea in COVID-19 patients |
| 10 | Leal-Martinez F. [31] | Mexico | 2022 | RCT | 80<br>Mean age (Probiotic group ): 51.5±11.4<br>Control group: 53.9±10.3 | Severe | *Saccharomyces boulardii* | 500 mg per day (6 days) | COVID-19 medications was given to both probiotic and non-probiotic groups | – | A nutritional supplement (consisting of probiotics, vitamins, minerals, amino acids...) had a meaningful beneficial effect on COVID-19 patients. Mortality↓<br>Need for ventilation↓<br>Mortality in intubated patients↓ |
| 11 | Li Q. [53] | China | 2021 | Retrospective | 311<br>60.1±12.37 | Severe | 1 (*Bifidobacterium longum* + *Streptococcus thermophiles* + *Lactobacillus bulgaricus*) tablet<br>2 (*Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium infantis* + *Bacillus cereus* + *Dung enterococcus*) tablet<br>3 (*Bacillus subtilis* + *Enterococcus faecium*) capsule | First combination: 2 g TDS<br>Second combination: 1.5 g TDS<br>Third combination: 0.5 g TDS | COVID-19 medications was given to both probiotic and non-probiotic groups | IL-6↑<br>ESR↑<br>Total T cells↑ | Probiotics did not decrease IL-6<br>Length of hospitalization was higher in probiotic group<br>Probiotics can decrease secondary infection through immunity moderation |
| 12 | Louca P. [34] | UK, USA, Sweden | 2021 | Cohort (online application survey) | 445 850<br>UK: probiotic: 49.57±14.2<br>Non-probiotic group: 46.26±14.4<br>USA: probiotic: 56.24±15.2<br>Non-probiotic: 47.8±16<br>Sweden: probiotic: 49±13<br>Non-probiotic: 46.63±12.9 | – | – | – | – | – | Women who consumed probiotics, Omega-3 or Vitamin D were less infected with corona disease<br>This correlation was not seen in men |

| ID | First author | Country | Year of publication | Type of study | No. of participants | Participants characteristics | Probiotics | Dose | Comparators | Effects of probiotics | Outcome |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | Meskina E. [38] | Russia | 2021 | Randomized prospective | 100<br>18–60 years | Moderate | *Bifidobacterium bifidum* 1 5108 CFU and 5107 CFU + *Lactobacillus plantarum* 8p-A3 | 3 capsule BD (10 days) | – | – | Patients who consumed the probiotic diarrhea resolved in a shorter time<br>Cough ↓<br>Hyposmia ↓<br>Weakness ↓ |
| 14 | Paparo L. [45] | Italy | 2021 | *In vitro* | – | – | *L. paracasei* CBAL74 | – | Non-fermented milk | IL-6↓<br>IL-15↓<br>VEGFβ↓<br>IL-1β↓ | Milk fermented with the probiotic led to meaningfully decreased in COVID-19 infected human enteric cells. May be caused through modulating ACE2 and inflammatory cytokines |
| 15 | Rather I. [47] | Korea | 2021 | *In vitro* and *in silico* | – | – | *Lactobacillus plantarum* Probio-88 | – | – | Il-6↓<br>IFNα↓<br>IFNβ↓ | *L. plantarum* had a meaningful beneficial effect on preventing the SARS-CoV-2 replication. Seems this ability may be caused by plantarcin E and F |
| 16 | Reiprich A. [48] | Germany | 2022 | *In vitro* | – | – | *Lactobacillus crispatus* DSM25988 | – | – | - | *L. crispatus* had beneficial effect on human cells to eliminate the SARS-CoV-2 virus |
| 17 | Salaris C. [49] | Italy | 2021 | *In vitro* | – | – | *Lacticaseibacillus paracasei* | | – | IFNα↑<br>IFNβ↑ | *L. paracasei* DG had a strong antiviral effect on SARS-CoV-2 *in vitro* and also decreased the replication of virus<br>*L. parasasei* enhanced the antiviral effect of lactoferrin on SARS-CoV-2 |
| 18 | Soloveva I. [55] | Russia | 2021 | *In vitro* | – | – | *Bifidobacterium bifidum* 1<br>*B. bifidum* 791<br>*Lactobacillus fermentum* 39<br>*L. fermentum* 90 TC-4<br>*Bifidobacterium longum* 379<br>*Lactobacillus plantarum* 8 RA 3 | – | – | – | Among the probiotics of this study only *L. fermentum* 90 TC 4 showed an antiviral effect on SARS-CoV-2 |
| 19 | Veterini A. [59] | Indonesia | 2021 | Case-Control | 30 Healthcare workers, probiotic group: 34.73±5.612<br>Non-probiotic group: 33.47±3.871 | – | – | – | – | – | Cycle threshold value and disease duration were not meaningfully different in two groups<br>Two individuals of non-probiotic group experienced reinfection |
| 20 | Wang H. [62] | China | 2021 | Retrospective cohort | 156<br>Average age: 48.58 | Mild, Moderate, Severe | *(Streptococcus thermophiles + Lactobacillus bulgaricus + Bifidobacterium longum)* tablet | 4 Tabs TDS | COVID-19 medications given to both probiotic and non-probiotic groups | CRP↓<br>prolactin↓<br>lymphocyte count↑<br>Serum albumin↑ | Patients who consumed probiotics COVID-19 test became negative in a shorter time and diarrhea resolved earlier |

**Table 2. Description of the findings reported in eligible studies (continued)**

| ID | First author | Country | Year of publication | Type of study | No. of participants | Participants characteristics | Probiotics | Dose | Comparators | Effects of probiotics | Outcome |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 21 | Wang Q. [63] | China | 2021 | RCT | 200 Healthy Healthcare workers, probiotic group: 36.13±8.62 Non-probiotic group: 35.74±8.88 | - | *S. thermophiles* ENT-K12 | 1 tablet BD (for 30 days) | - | - | Consumption of probiotics as prophylaxis in healthcare workers who had close contact with COVID-19 patients: Respiratory tract infection ↓ Need for medications (antiviral, etc.) during COVID-19 disease ↓ Days needed to stay home during disease ↓ Duration of disease ↓ |
| 22 | Wischmeyer P. [64] | USA | 2022 | RCT | 182 | - | *Lactobacillus rhamnosus* GG | - | Placebo | - | Consumption of probiotics in individuals who had close contact with COVID-19 patients was linked to a longer period for symptoms to appear and probiotic group experienced fewer symptoms |
| 23 | Zhang L. [67] | China | 2021 | Cohort | 375 Probiotic group: 36–59 Non-probiotic: 36–62 | Mild, Moderate, Severe | (*Lactobacillus* + *Entrococcus* + *Bifidobacterium*) capsule | 630 mg BD (3 capsules BD) | COVID-19 medications was given to both probiotic and non-probiotic groups | - | Probiotic consumption was linked to: Length of hospitalization ↓ Shedding of virus ↓ Fever duration ↓ |

## Discussion

The aim of this systematic review was to investigate the effect of probiotics on COVID-19. The results of this review are based on 23 studies that used various study designs. The findings suggest that the greatest impact of probiotics on COVID-19 is related to controlling inflammation, reducing mortality and morbidity by strengthening and regulating the immune system. Additionally, some probiotics may play an effective role in controlling the symptoms and severity of COVID-19, which will be detailed below.

Previous studies have demonstrated that generally probiotics are complementary options for the treatment and prevention of viral and bacterial infections. Probiotics have also been shown to exert anti-viral effects via diverse mechanisms such as: regulation and modulation of innate and adaptive immune system, maintaining gut and lung mucosal integrity, as well as inhibiting and binding to opportunistic pathogens [27, 50, 61]. Regarding upper respiratory tract infections (URTIs), one meta-analysis of RCTs with 3720 cases showed that patients undergoing probiotics treatment had two-times lower odds of developing URTIs [23]. Regarding lower RTIs, another meta-analyses of RCTs with 2000 patients showed that probiotic use can significantly decrease the ventilator-associated pneumonia incidence [13, 57]. Further, a large meta-analysis of 52 articles stated that probiotics were strongly efficient in the prevention or treatment of acute RTIs [33].

Regarding the effects of probiotics on COVID-19, many studies have shown gut dysbiosis among COVID-19 patients such as alterations in *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. Therefore, probiotic implementation, specifically with these strains, may lead to beneficial outcomes when managing this disease [18]. In one systematic review, probiotic use was suggested to improve host immune response against COVID-19 by three possible mechanisms. These include altering the level of interleukins (IL), virus titers reduction, and interferon and antibody production [39]. Moreover, a review by Batista et al. proposed that probiotic consumption can ameliorate COVID-19 symptoms via regulating, and boosting an individuals' immune response, and improving their gut microbiota in favor of protective microflora [10]. Authors from another review suggested that immune system improvement against COVID-19 can be achieved via intestinal microbiota profile enhancement by probiotic use [2]. Similarly, a study that included a large online cohort of 445 850 individuals, documented that women who consumed probiotics, Omega-3 or Vitamin-D were less infected by SARS-CoV-2, although this was not the case among males [34].

Seven studies included in the present review mentioned *Bifidobacterium* solely or in combination with other bacteria as the studied probiotic [38, 67, 14,

26, 53, 55, 62]. Two studies reported shorter hospitalization periods in the *Bifidobacterium*-receiving group [14, 67]. Bozkurt et al. investigated mild to moderate COVID-19 cases and found that chest CT scan resolved faster, and lower mortalities occurred among patients receiving *Bifidobacterium* compared to patients treated with anti-ILs or antibiotics [14]. They also stated that probiotics use decreased IL-6 levels [14]. Moreover, Zhang et al. in their study among mild, moderate, and severe cases of COVID-19 found that consumption of probiotics composed of *Lactobacillus, Entrococcus*, and *Bifidobacterium genera* was associated with reduced length of hospitalization, virus shedding, and fever duration [67]. Previous studies have demonstrated that loss of *Bifidobacterium* in the elderly is associated with chronic diseases [29]. In addition, one review investigated the possible effects of probiotics, and signified that *Bifidobacterium longum* MM-2, *Bifidobacterium longum* BB536, B*ifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (BB-12®), *Bifidobacterium longum* SPM1205, and SPM1206, and *Bifidobacterium longum* SP 07/3 and *B. bifidum* MF 20/5 are among probiotics strains that possess anti-viral features. These results were found in both *in vitro*, and *in vivo* studies as follows, suppressing uncontrolled inflammatory response, reducing virus proliferation in the lungs, increasing adaptive immune response to vaccines, and reducing episodes and severity of URTIs. In addition, many studies on *Bifidobacterium* indicate that this strain may be considered as a complementary therapeutic agent in suppressing cytokine storm, and uncontrolled inflammatory response in COVID-19 patients [12, 19, 42]. Therefore, *Bifidobacterium* appears to be helpful in combating COVID-19 infection via numerous mechanisms.

In terms of signs and symptoms of COVID-19, four studies reported that probiotics use was efficient in relieving diarrhea, cough, anosmia, weakness, preventing nosocomial diarrhea, and decreasing secondary infection [26, 38, 53, 62]. Ivashkin et al. in their RCT reported that despite relieving GI symptoms, probiotics had no meaningful effect on COVID-19 severity. Other similar studies have also reported consistent results, and reported that probiotics use is a beneficial tool for treating gut dysbiosis and improvement of GI symptoms [52]. One study reported that by using a combination of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, and *Bacillus* tablets, a better immune function and reduced secondary bacterial or fungal infection can be achieved [32]. Moreover, one large systematic review among COVID-19 patients indicated that consumption of probiotics, prebiotics, and synbiotics, via gut/lung microbiome modulation, can shorten disease duration, and decrease its severity of symptoms including fatigue, anosmia, dyspnea, nausea, vomiting and other GI symptoms [65].

With the renowned systemic inflammatory response triggered by SARS-CoV-2, the physiological balance of the gut-brain, gut-heart, and gut-lung axis gets disrupted [11]. Thus, adequate metabolic modulation and preservation of the microbial diversity may be an additional tool to enhance innate immunity and positively modulate the inflammatory response. In a recently published review [56], Spagnolello et al., elegantly summarized the existing evidence around the onset of microbial intestinal dysbiosis in patients with COVID-19, linking the disruption in the normal intestinal flora to a dysregulated immune response [46]. Indeed, the COVID-19 infection was proven to last for a longer period of time in patients with a history of various gastrointestinal diseases [44]. Although the exact pathophysiology of this process remains unknown, potential explanatory models have been recently illustrated [60]. The process may lay in its foundation on the activation of the ACE2 receptors on the intestinal mucosa, which induces enteritis, alteration in the local T cells and B cells response, and eventually inflammatory diarrhea.

Various *in vitro* studies have tried to probe the positive effects of probiotics in normalizing or attenuating inflammatory responses [17, 45, 47, 48, 49]. Ezzat et al. [17] showed that a combination of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterococcus faecalis* have meaningful antiviral effects on SARS-CoV-2. This highlights the positive effect of this probiotic polysaccharide made of D-fructose units in COVID-19 modulation, in addition to its renown roles [51]. Similarly, another *in vitro* study [45] showed that non-fermented milk subsequently fermented with the probiotic *L. paracasei* could significantly decrease the number of human enteric cells infected by the SARS-CoV-2 virus and led to lower levels of IL-1-beta, IL-6, IL-15, and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beta. Three additional *in vitro* studies [47, 48, 49] elucidated a similar role of other *Lactobacillus* species. Specifically, *Lactobacillus plantarum* was proven to have a meaningful effect on preventing the replication of the SARS-CoV-2 virus, probably by the means of plantarcin E and plantarcin F [47], while *Lactobacillus crispatus* (i.e., DSM25988) was proven to have a beneficial effect on human cells in the process of eliminating the SARS-CoV-2 virus [48]. Finally, *Lactobacillus paracasei* was shown to have strong antiviral effects on the SARS-CoV-2 virus by decreasing the replication of the virus per se and by enhancing the antiviral effect of lactoferrin [49]. Analogous positive effects have also been conceptually confirmed by an *in silico* study by Alam et al. showing that bacterial compounds extracted from *Bacillus* species may represent a potential source of SARS-CoV-2 protease inhibitors [3]. *In vitro* and in silico studies are therefore providing an increasing body of molecular evidence in support of the role of probiotics in both counteracting the life cycle of SARS-CoV-2 and modulating the relatedinflammatory response [43].

When moving from the bench to the bedside, a handful of RCTs have recently investigated the effects of certain probiotics on COVID-19 infections [16, 21, 22, 31, 63, 64]. While a variety of different probiotic types and dosages were used, thus hindering any chances of drawing meta-analytic comparisons, few considerations can be made from their results, leveraging the rigorous methodology of clinical trials. Gutierrez-Castrellon et al. [21] enrolled 300 patients with mild to moderate COVID-19 infection and supplemented them with a mix of probiotics (e.g., *Pediococcus acidi lacti*, *Lactiplanti bacills plantarum*, etc.). When compared to placebo, they reported that probiotics could shorten the duration of COVID-19-related symptoms in enrolled patients, as well as decrease the radiologic burden of disease when assessed by CT imaging. The authors speculated an association between their clinical findings and the detection of higher levels of virus-specific IgM and IgG, lower levels of high-sensitivity C-reactive protein, and overall lower levels of nasopharyngeal viral load, which are renown proxy of inflammatory response and burden of disease in COVID-19 patients [58].

Another RCT reported significantly higher remission rates among a probiotic group compared to a placebo group (53.1% vs 28.1%). [20] The results from this RCT also found that treatment was linked to lower nasopharyngeal viral load, pulmonary infiltrations, and shortened duration of symptoms, compared to a control group [20]. Another RCT demonstrated that probiotics were able to modulate the immune performance, and decrease secondary infection [32]. Moreover, in terms of COVID-19 prevention, many studies have shown that probiotics can block the Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) receptor by binding to active sites, and thus act as a possible preventive measure against SARS-CoV-2. Also, probiotics in foods, such as dairy products can exert a potentially efficient impact to prevent COVID-19. Extensive research among infants, children, adults, and people of older age have shown that probiotic-containing fermented milk significantly reduces the incidence of URTIs [35, 37].

Analogously, Wischmeyer et al. investigated the protective role of *Lactobacillus rhamnosus* [64]. They enrolled 182 individuals who were self-identified as close contacts of SARS-CoV-2-positive patients. The researchers found that those who received *Lactobacillus* and eventually contracted COVID-19 had a prolonged latency for symptoms onset and milder symptoms compared to the placebo group. This allowed the research group to add to the existing literature on the topic [30] by hypothesizing an effective role of probiotics in the early phases of the COVID-19 infection, from the first contact to onset of typical symptoms. Interestingly, a similar clinical trial has been tailored to healthcare providers and first responders, who are at close contact with COVID-19 patients. Wang et al. [63] showed that the administration of one tablet of *S. thermophiles* (ENT-K12) daily for a 30-day timespan was associated with an effective prophylaxis, leading to a lower rate of respiratory tract infections, lower number of prescribed medications in the patients who eventually became infected, as well as a shorter recovery.

There is a growing body of clinical studies and RCTs supporting consumption of probiotics for the prevention and supportive treatment of patients with the SARS-CoV-2 infection. The pleiotropism of available probiotics may enhance the process of strengthening biological barriers in the gastrointestinal tract and facilitate the homeostasis within the normal flora. In spite of the enthusiasm that surrounds the adoption of probiotics in this setting, a word of caution is warranted. Specifically, three adverse reports have been recently published showing that the efficacy and safety of certain probiotics (e.g., *Salmonella enterica, Lactobacillus acidophilus*, and *Bacillus clausii*) in this setting is contentious [30].

## Conclusion

To date, the fight against COVID-19 causes and requires more interventions to manage it. Related interventions and prevention of new cases places large economic burdens on governments, and effective interventions can make disease control possible. Therefore, probiotics intake could be a complementary strategy to effectively control the disease along with the vaccines, due to their antiviral properties and their metabolites. Probiotics are considered an anti-COVID-19 strategy because of its effect on ameliorating gut microbiota and boosting response of immune host. Additionally, probiotics reduce the risk of secondary infection by making immune function moderate. Available evidence on probiotics can be utilize as a valuable source for investigating the antiviral role of probiotics in related research studies. In this review, the antiviral potential of *Lactobacillus paracasei* metabolite PlnE and PlnF against SARS-CoV-2 was found. Other and new types of probiotics may be considered for health promotion, disease prevention, and treatment of various diseases. More studies are needed to investigate the relationship between probiotics and the management of COVID-19.

## Declarations

**Ethics approval and consent to participate.** Not applicable.

**Consent to publication.** Not applicable.

**Availability of data and material.** The authors stated that all information provided in this article could be shared.

**Competing interests.** The authors declare that

there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

**Funding.** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Acknowledgments.** The present study was conducted in collaboration with Khalkhal University of Medical Sciences, Iranian Research Center for HIV/AIDS, Tehran University of Medical Sciences, and the University of Sydney.

## References

1. Aguila E.J.T., Lontok M.A.D., Aguila E.J.T. Role of probiotics in the COVID-19 pandemic. *Aliment. Pharmacol. Ther., 2020, vol. 52, no. 5: 931. doi: 10.1111/apt.15898*
2. Akour A. Probiotics and COVID-19: is there any link? *Lett. Appl. Microbiol. 2020, vol. 71, no. 3, pp. 229–234. doi: 10.1111/lam.13334*
3. Alam S., Sadiqi S., Sabir M., Nisa S., Ahmad S., Abbasi S.W. Bacillus species; a potential source of anti-SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn., 2022, vol. 40, no. 13, pp. 5748–5758. doi: 10.1080/07391102.2021.1873188*
4. Angurana S.K., Bansal A. Probiotics and Coronavirus disease 2019: think about the link. *Br. J. Nutr., 2021, vol. 126, no. 10, pp. 1564–1570. doi: 10.1017/S000711452000361X*
5. Antunes A.E., Vinderola G., Xavier-Santos D., Sivieri K. Potential contribution of beneficial microbes to face the COVID-19 pandemic. *Food Res. Int. 2020, vol. 136: 109577. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109577*
6. Ayyash M.M., Sherkat F., Shah N.P. The effect of NaCl substitution with KCl on Akawi cheese: chemical composition, proteolysis, angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity, probiotic survival, texture profile, and sensory properties. *J. Dairy Sci., 2012, vol. 95, no. 9, pp. 4747–4759. doi: 10.3168/jds.2011-4940*
7. Ayyash M., Olaimat A., Al-Nabulsi A., Liu S-Q. Bioactive properties of novel probiotic Lactococcus lactis fermented camel sausages: cytotoxicity, angiotensin converting enzyme inhibition, antioxidant capacity, and antidiabetic activity. *Food Sci. Anim. Resour., 2020, vol. 40, no. 2: 155. doi: 10.5851/kosfa.2020.e1*
8. Baindara P., Chakraborty R., Holliday Z.M., Mandal S.M., Schrum A.G. Oral probiotics in coronavirus disease 2019: connecting the gut–lung axis to viral pathogenesis, inflammation, secondary infection and clinical trials. *New Microbes New Infect., 2021: 100837. doi: 10.1016/j.nmni.2021.100837*
9. Barber M.S., Barrett R., Bradley R.D., Walker E. A naturopathic treatment approach for mild and moderate COVID-19: a retrospective chart review. *Complement Ther. Med., 2021, vol. 63: 102788. doi: 10.1016/j.ctim.2021.102788*
10. Batista K.S., de Albuquerque J.G., Vasconcelos M.H.A., Bezerra M.L.R., da Silva Barbalho M.B., Pinheiro R.O., Aquino J.S. Probiotics and prebiotics: potential prevention and therapeutic target for nutritional management of COVID-19? *Nutr. Res. Rev., 2021, pp. 1–18. doi: 10.1017/S0954422421000317*
11. Baud D., Dimopoulou Agri V., Gibson G.R., Reid G., Giannoni E. Using probiotics to flatten the curve of Coronavirus Disease COVID-2019 pandemic. *Front. Public Health., 2020, vol. 8: 186. doi: 10.3389/fpubh.2020.00186*
12. Bhushan I., Sharma M., Mehta M., Badyal S., Sharma V., Sharma I., Singh H., Sistla S. Bioactive compounds and probiotics — a ray of hope in COVID-19 management. *Food Science and Human Wellness, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 131–40. doi: 10.1016/j.fshw.2021.02.001*
13. Bo L., Li J., Tao T., Bai Y., Ye X., Hotchkiss R.S., Kollef M.H., Crooks N.H., Deng X. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst. Rev., 2014, vol. 10, no. 10: CD009066. doi: 10.1002/14651858.CD009066.pub2*
14. Bozkurt H.S., Bilen O. Oral booster probiotic bifidobacteria in SARS-CoV-2 patients. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2021, vol. 35: 20587384211059677. doi: 10.1177/20587384211059677*
15. Dadras O., SeyedAlinaghi S. COVID-19 mortality and its predictors in the elderly: a systematic review. *Health Sci. Rep., 2022, vol. 5, no. 3: e657. doi: 10.1002/hsr2.657*
16. D'Ettorre G., Ceccarelli G., Marazzato M., Campagna G., Pinacchio C., Alessandri F., Ruberto F., Rossi G., Celani L., Scagnolari C., Mastropietro C., Trinchieri V., Recchia G.E., Mauro V., Antonelli G., Pugliese F., Mastroianni C.M. Challenges in the management of SARS-CoV-2 infection: the role of oral bacteriotherapy as complementary therapeutic strategy to avoid the progression of COVID-19. *Front. Med. (Lausanne), 2020, vol. 7: 389. doi: 10.3389/fmed.2020.00389*
17. Ezzat A., Abdelsamad N.O., Gamal A.A., Shehata M., Mahmoud S.H., Mostafa A., Ali M.A., Esawy M.A. Possible correlation between the probiotic activity of bacterial honey isolates and the in vitro inhibition of coronavirus 2 replication responsible for acute respiratory syndromes. *Egyptian Journal of Chemistry, 2022, vol. 65, no. 9, pp. 467–476.*
18. Farsi Y., Tahvildari A., Arbabi M., Vazife F., Sechi L.A., Shahidi Bonjar A.H., Jamshidi P., Nasiri M.J., Mirsaeidi M. Diagnostic, prognostic, and therapeutic roles of gut microbiota in COVID-19: a comprehensive systematic review. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2022, vol. 12: 804644. doi: 10.3389/fcimb.2022.804644*
19. Gautier T., Gall D.-L., Sweidan A., Tamanai-Shacoori Z., Jolivet-Gougeon A., Loréal O., Bousarghin L. Next-generation probiotics and their metabolites in COVID-19. *Microorganisms, 2021, vol. 9, no. 5: 941. doi: 10.3390/microorganisms9050941*
20. Gutiérrez-Castrellón P., Gandara-Martí T., Abreu A.T., Nieto-Rufino C.D., López-Orduña E., Jiménez-Escobar I., Jiménez-Gutiérrez C., López-Velazquez G., Espadaler-Mazo J. Efficacy and safety of novel probiotic formulation in adult Covid19 outpatients: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *medRxiv, 2021. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.08.023*
21. Gutierrez-Castrellon P., Gandara-Marti T., Abreu A., Nieto-Rufino C.D., Lopez-Orduna E., Jimenez-Escobar I., Jiménez-Gutiérrez C., López-Velazquez G., Espadaler-Mazo J. Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-controlled trial. *Gut Microbes, 2022, vol. 14, no. 1: 2018899. doi: 10.1080/19490976.2021.2018899*

22. Gutierrez-Castrellon P., Gandara-Marti T., Espadaler-Mazo J. Probiotic effect on SARS-CoV-2 immunity is associated to type-I interferons: a post-hoc analysis of a randomized, placebo-controlled trial. *FASEB J., 2022: 36.*
23. Hao Q., Dong B.R., Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst. Rev., 2015, no. 2: CD006895. doi: 10.1002/14651858.CD006895.pub3*
24. Hegazy M., Ahmed Ashoush O., Tharwat Hegazy M., Wahba M., Lithy R.M., Abdel-Hamid H.M., Ahmed Abd Elshafy S., Abdelfatah D., El-Din Ibrahim M.H., Abdelghani A. Beyond probiotic legend: ESSAP gut microbiota health score to delineate SARS-CoV-2 infection severity. *Br. J. Nutr., 2022, vol. 127, no. 8, pp. 1180–1189. doi: 10.1017/S0007114521001926*
25. Infusino F., Marazzato M., Mancone M., Fedele F., Mastroianni C.M., Severino P., Ceccarelli G., Santinelli L., Cavarretta E., Marullo A.G.M., Miraldi F., Carnevale R., Nocella C., Biondi-Zoccai G., Pagnini C., Schiavon S., Pugliese F., Frati G., d'Ettorre G. Diet supplementation, probiotics, and nutraceuticals in SARS-CoV-2 infection: a scoping review. *Nutrients, 2020, vol. 12, no. 6: 1718. doi: 10.3390/nu12061718*
26. Ivashkin V., Fomin V., Moiseev S., Brovko M., Maslennikov R., Ulyanin A., Sholomova V., Vasilyeva M., Trush E., Shifrin O., Poluektova E. Efficacy of a probiotic consisting of Lacticaseibacillus rhamnosus PDV 1705, Bifidobacterium bifidum PDV 0903, Bifidobacterium longum subsp. infantis PDV 1911, and Bifidobacterium longum subsp. longum PDV 2301 in the treatment of hospitalized patients with covid-19: a randomized controlled trial. *Probiotics Antimicrob. Proteins., 2023, vol. 15, no. 3, pp. 460–468. doi: 10.1007/s12602-021-09858-5*
27. Kanauchi O., Andoh A., AbuBakar S., Yamamoto N. Probiotics and paraprobiotics in viral infection: clinical application and effects on the innate and acquired immune systems. *Curr. Pharm. Des., 2018, vol. 24, no. 6, pp. 710–717. doi: 10.2174/1381612824666180116163411*
28. Ke E., Zhang H. Clinical effects of probiotics in ordinary-type COVID-19 patients with diarrhea. *World Chinese Journal of Digestology, 2020, vol. 28, no. 17, pp. 834–838.*
29. Kelly S.M., Munoz-Munoz J., Van Sinderen D. Plant glycan metabolism by bifidobacteria. *Front. Microbiol., 2021, vol. 12: 609418. doi: 10.3389/fmicb.2021.609418*
30. Kurian S.J., Unnikrishnan M.K., Miraj S.S., Bagchi D., Banerjee M., Reddy B.S., Rodrigues G.S., Manu M.K., Saravu K., Mukhopadhyay C., Rao M. Probiotics in prevention and treatment of COVID-19: current perspective and future prospects. *Arch. Med. Res., 2021, vol. 52, no. 6, pp. 582–594. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.03.002*
31. Leal-Martinez F., Abarca-Bernal L., Garcia-Perez A., Gonzalez-Tolosa D., Cruz-Cazares G., Montell-Garcia M., Ibarra A. Effect of a nutritional support system to increase survival and reduce mortality in patients with COVID-19 in stage III and comorbidities: a blinded randomized controlled clinical trial. *Int. J. Environ. Res. Public Health, 2022, vol. 19, no. 3: 1172. doi: 10.3390/ijerph19031172*
32. Li Q., Cheng F., Xu Q., Su Y., Cai X., Zeng F., Zhang Y. The role of probiotics in coronavirus disease-19 infection in Wuhan: a retrospective study of 311 severe patients. *Int. Immunopharmacol., 2021, vol. 95: 107531. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107531*
33. Liu Y., Tran D.Q., Rhoads J.M. Probiotics in disease prevention and treatment. *J. Clin. Pharmacol., 2018, vol. 58, no. S10, pp. S164–S79. doi: 10.1002/jcph.1121*
34. Louca P., Murray B., Klaser K., Graham M.S., Mazidi M., Leeming E.R., Thompson E., Bowyer R., Drew D.A., Nguyen L.H., Merino J., Gomez M., Mompeo O., Costeira R., Sudre C.H., Gibson R., Steves C.J., Wolf J., Franks P.W., Ourselin S., Chan A.T., Berry S.E., Valdes A.M., Calder P.C., Spector T.D., Menni C. Modest effects of dietary supplements during the COVID-19 pandemic: insights from 445 850 users of the COVID-19 Symptom Study app. *BMJ Nutr. Prev. Health, 2021, vol. 4, no. 1, pp. 149–157. doi: 10.1136/bmjnph-2021-000250*
35. Makino S., Ikegami S., Kume A., Horiuchi H., Sasaki H., Orii N. Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1. *Br. J. Nutr., 2010, vol. 104, no. 7, pp. 998–1006. doi: 10.1017/S000711451000173X*
36. Mehraeen E., Salehi M.A., Behnezhad F., Moghaddam H.R., SeyedAlinaghi S. Transmission modes of COVID-19: a systematic review. *Infect. Disord. Drug Targets, 2021, vol. 21, no. 6: e170721187995. doi: 10.2174/1871526520666201116095934*
37. Merenstein D., Murphy M., Fokar A., Hernandez R.K., Park H., Nsouli H., Sanders M.E., Davis B.A., Niborski V., Tondu F., Shara N.M. Use of a fermented dairy probiotic drink containing Lactobacillus casei (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr., 2010, vol. 64, no. 7, pp. 669–677. doi: 10.1038/ejcn.2010.65*
38. Meskina E.R., Tselipanova E.E., Khadisova M.K., Galkina L.A., Stashko T.V. Efficiency of application of sorbed probiotics in complex therapy of pneumonia caused by SARS-CoV-2. Part 1. Heating clinical displays period. *Ter. Arkh., 2021, vol. 93, no. 4, pp. 456–464. doi: 10.26442/00403660.2021.04.200835*
39. Mirashrafi S., Moravejolahkami A.R., Balouch Zehi Z., Hojjati Kermani M.A., Bahreini-Esfahani N., Haratian M., Ganjali Dashti M., Pourhossein M. The efficacy of probiotics on virus titres and antibody production in virus diseases: a systematic review on recent evidence for COVID-19 treatment. *Clin. Nutr. ESPEN, 2021, vol. 46, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.clnesp.2021.10.016*
40. Miremadi F., Ayyash M., Sherkat F., Stojanovska L. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. *J. Funct. Foods, 2014, vol. 9, pp. 295–305.*
41. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D.G., Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann. Intern. Med., 2009, vol. 151, no. 4, pp. 264–269. doi: 10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135*
42. Mohseni A.H., Casolaro V., Bermúdez-Humarán L.G., Keyvani H., Taghinezhad-S S. Modulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by probiotics as a fruitful target for orchestrating the immune response. *Gut Microbes, 2021, vol. 13, no. 1: 1886844. doi: 10.1080/19490976.2021.1886844*
43. Nguyen Q.V., Chong L.C., Hor Y.Y., Lew L.C., Rather I.A., Choi S.B. Role of probiotics in the management of COVID-19: a computational perspective. *Nutrients, 2022, vol. 4, no. 2: 274. doi: 10.3390/nu14020274*

44. Nobel Y.R., Phipps M., Zucker J., Lebwohl B., Wang T.C., Sobieszczyk M.E., Freedberg D.E. Gastrointestinal symptoms and Coronavirus Disease 2019: a case-control study from the United States. *Gastroenterology, 2020, vol. 159, no. 1, pp. 373–375.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2020.04.017*
45. Paparo L., Bruno C., Ferrucci V., Punto E., Viscardi M., Fusco G., Cerino P., Romano A., Zollo M., Berni Canani R. Protective effects elicited by cow milk fermented with L. Paracasei CBAL74 against SARS-CoV-2 infection in human enterocytes. *J. Funct. Foods, 2021, vol. 87: 104787. doi: 10.1016/j.jff.2021.104787*
46. Pouya F., Imani Saber Z., Kerachian M.A. Molecular aspects of co-morbidities in COVID-19 infection. *Arch. Bone Jt. Surg., 2020, vol. 8 (suppl. 1), pp. 226–230. doi: 10.22038/abjs.2020.47828.2361*
47. Rather I.A., Choi S.B., Kamli M.R., Hakeem K.R., Sabir J.S.M., Park Y.H., Hor Y.Y. Potential adjuvant therapeutic effect of Lactobacillus plantarum Probio-88 postbiotics against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 9, no. 10: 1067. doi: 10.3390/vaccines9101067*
48. Reiprich A., Skalden L., Raab A., Bolotina N., Lang C. Lactobacillus crispatus DSM25988 as novel bioactive agent to co-aggregate Streptococcus pyogenes and to exclude it by binding to human cells. *Benef. Microbes, 2022, vol. 13, no. 1, pp. 83–94. doi: 10.3920/BM2021.0103*
49. Salaris C., Scarpa M., Elli M., Bertolini A., Guglielmetti S., Pregliasco F., Brun P., Castagliuolo I. Lacticaseibacillus paracasei DG enhances the lactoferrin anti-SARS-CoV-2 response in Caco-2 cells. *Gut Microbes, 2021, vol. 13, no. 1: 1961970. doi: 10.1080/19490976.2021.1961970*
50. Samuelson D.R., Welsh D.A., Shellito J.E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front. Microbiol., 2015, vol. 6: 1085. doi: 10.3389/fmicb.2015.01085*
51. Sanders M.E., Merenstein D.J., Reid G., Gibson G.R., Rastall R.A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., 2019, vol. 16, no. 10, pp. 605–616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3*
52. Schiavi E., Gleinser M., Molloy E., Groeger D., Frei R., Ferstl R., Rodriguez-Perez N., Ziegler M., Grant R., Moriarty T.F., Plattner S., Healy S., O'Connell Motherway M., Akdis C.A., Roper J., Altmann F., van Sinderen D., O'Mahony L. The surface-associated exopolysaccharide of Bifidobacterium longum 35624 plays an essential role in dampening host proinflammatory responses and repressing local TH17 responses. *Appl. Environ. Microbiol., 2016, vol. 82, no. 24, pp. 7185–7196. doi: 10.1128/AEM.02238-16*
53. SeyedAlinaghi S., Afsahi A.M., MohsseniPour M., Behnezhad F., Salehi M.A., Barzegary A., Mirzapour P., Mehraeen E., Dadras O. Late complications of COVID-19; a systematic review of current evidence. *Arch. Acad. Emerg. Med., 2021, vol. 9, no. 1: e14. doi: 10.22037/aaem.v9i1.1058*
54. SeyedAlinaghi S., Karimi A., Mojdeganlou H., Alilou S., Mirghaderi S.P., Noori T., Shamsabadi A., Dadras O., Vahedi F., Mohammadi P., Shojaei A., Mahdiabadi S., Janfaza N., Keshavarzpoor Lonbar A., Mehraeen E., Sabatier J.M. Impact of COVID-19 pandemic on routine vaccination coverage of children and adolescents: a systematic review. *Health Sci. Rep., 2022, vol. 5, no. 2: e00516. doi: 10.1002/hsr2.516*
55. Soloveva I.V., Ilyicheva T.N., Marchenko V.Y., Pyankov O.V., Tochilina A.G., Belova I.V., Zhirnov V.A., Bormotov N.I., Skarnovich M.O., Durymanov A.G., Molodtsova S.B., Filippova E.I., Ovchinnikova A.S., Magerramova A.V., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A. Genome features and *in vitro* activity against influenza A and SARS-CoV-2 viruses of six probiotic strains. *Biomed. Res. Int., 2021, vol. 2021: 6662027. doi: 10.1155/2021/6662027*
56. Spagnolello O., Pinacchio C., Santinelli L., Vassalini P., Innocenti G.P., De Girolamo G., Fabris S., Giovanetti M., Angeletti S., Russo A., Mastroianni C.M., Ciccozzi M., Ceccarelli G., d'Ettorre G. Targeting microbiome: an alternative strategy for fighting SARS-CoV-2 infection. *Chemotherapy, 2021, vol. 66, no. (1–2), pp. 24–32. doi: 10.1159/000515344*
57. Su M., Jia Y., Li Y., Zhou D., Jia J. Probiotics for the prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Respiratory Care, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 673–685. doi: 10.4187/respcare.07097*
58. Sun J., Tang X., Bai R., Liang C., Zeng L., Lin H., Yuan R., Zhou P., Huang X., Xiong Q., Peng J., Cui F., Ke B., Su J., Liu Z., Lu J., Tian J., Sun R., Ke C. The kinetics of viral load and antibodies to SARS-CoV-2. *Clin. Microbiol. Infect., 2020, vol. 26, no. 12, pp. 1690.e1–1690.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2020.08.043*
59. Veterini A.S., Kurniawati E.M., Hamzah, Soedarmo S.M., Prakoeswa C.R.S., Tinduh D. Probiotics intake as adjunct therapy for infected health-care with SARS-CoV-2. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology, 2021, vol. 15, no. 2, pp. 4021–4025. doi: 10.37506/ijfmt.v15i2.15003*
60. Villapol S. Gastrointestinal symptoms associated with COVID-19: impact on the gut microbiome. *Transl Res., 2020, vol. 226, pp. 57–69. doi: 10.1016/j.trsl.2020.08.004*
61. Wan L.Y., Chen Z.J., Shah N.P., El-Nezami H. Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr., 2016, vol. 56, no. 16, pp. 2628–2641. doi: 10.1080/10408398.2014.905450*
62. Wang H., Wang Y., Lu C., Qiu L., Song X., Jia H., Cui D., Zhang G. The efficacy of probiotics in patients with severe COVID-19. *Ann. Palliat. Med., 2021, vol. 10, no. 12, pp. 12374–12380. doi: 10.21037/apm-21-3373*
63. Wang Q., Lin X., Xiang X., Liu W., Fang Y., Chen H., Tang F., Guo H., Chen D., Hu X., Wu Q., Zhu B., Xia J. Oropharyngeal probiotic ENT-K12 prevents respiratory tract infections among frontline medical staff fighting against COVID-19: a pilot study. *Front. Bioeng Biotechnol., 2021, vol. 9: 646184. doi: 10.3389/fbioe.2021.646184*
64. Wischmeyer P.E., Tang H., Ren Y., Bohannon L., Ramirez Z.E., Andermann T.M., Messina J.A., Sung J.A., Jensen D., Jung S.-H., Artica A., Britt A., Bush A., Johnson E., Lew M.V., Miller H.M., Pamanes C.E., Racioppi A., Zhao A.T., Surana N.K., Sung A.D. Daily Lactobacillus probiotic versus placebo in COVID-19-exposed household contacts (PROTECT-EHC): a randomized clinical trial. *medRxiv, 2022: 21268275 doi: 10.1101/2022.01.04.21268275*
65. Xavier-Santos D., Padilha M., Fabiano G.A., Vinderola G., da Cruz A.G., Sivieri K., Costa Antunes A.E. Evidences and perspectives of the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics as adjuvants for prevention and treatment of COVID-19: a bibliometric analysis and systematic review. *Trends Food Sci. Technol., 2022, vol. 120, pp. 174–192. doi: 10.1016/j.tifs.2021.12.033*

66. Zafar N., Aslam M.A., Ali A., Khatoon A., Nazir A., Tanveer Q., Bilal M., Kanwar R., Qadeer A., Sikandar M., Zafar A. Probiotics: Helpful for the prevention of COVID-19? *Biomedical Research and Therapy, 2020, vol. 7, no. 11, pp. 4086–4099.*
67. Zhang L., Han H., Li X., Chen C., Xie X., Su G., Ye S., Wang C., He Q., Wang F., Huang F., Wang Z., Wu J., Lai T. Probiotics use is associated with improved clinical outcomes among hospitalized patients with COVID-19. *Therap. Adv. Gastroenterol., 2021, vol. 14: 17562848211035670. doi: 10.1177/17562848211035670*

**Авторы:**
**СейедАлинаги С.**, магистр философии, кандидат наук, клинический эпидемиолог, доцент, зам. руководителя по исследовательской деятельности Иранского исследовательского центра по ВИЧ/СПИД, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран;
**Шахиди Р.**, врач, медицинский факультет Бушерского университета медицинских наук, г. Бушер, Иран;
**Афзалян А.**, врач, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;
**Паранджху П.**, магистр общественного здравоохранения, научный сотрудник Турпанджянского колледжа медицинских наук Американского университета Армении, Ереван;
**Горбанзаде К.**, кандидат наук (сестринское дело), кафедра сестринского дела Халхальского медицинского университета, г. Халхал, Иран;
**Мождеганлу Х.**, врач, кафедра патологии, Университет Джона Хопкинса, Медицинский факультет, г. Балтимор, Мэриленд, США;
**Рази А.**, врач, кафедра внутренних болезней Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;
**Мождеганлу П.**, врач, Университет медицинских наук им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран;
**Дашти М.**, врач, кафедра радиологии Тебризского университета медицинских наук, г. Тебриз, Иран;
**Гасемзаде А.**, врач, кафедра радиологии Тебризского университета медицинских наук, г. Тебриз, Иран;
**Парихани С.**Н., бакалавр сестринского дела, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;
**Пашай А.**, аспирант, факультет сестринского дела Университета Британской Колумбии, г. Ванкувер, Канада;
**Карими А.**, врач, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;
**Ахмади С.**, врач, медицинский факультет Тегеранского университета медицинских наук, Тегеран, Иран;
**Мехраин Э.**, кандидат наук, ассистент кафедры медицинских информационных технологий Халхальского медицинского университета, г. Халхал, Иран;
**Хакетт Д.**, кандидат наук (спортивная медицина), преподаватель спортивной медицины факультета медицины и здравоохранения Школы медицинских наук Сиднейского университета, г. Сидней, Новый Южный Уэльс, Австралия.

**Authors:**
**SeyedAlinaghi S.**, MD, MPhil, PhD, Clinical Epidemiologist, Associate Professor, Research Deputy of Iranian Research Center for HIV/AIDS (IRCHA), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
**Shahidi R.**, MD, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran;
**Afzalian A.**, MD, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
**Paranjkhoo P.**, MD, MPH, Researcher, Turpanjian College of Health Sciences, American University of Armenia, Yerevan, Armenia;
**Ghorbanzadeh K.**, PhD (Nursing), Department of Nursing, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran;
**Mojdeganlou H.**, MD, Department of Pathology, School of Medicine, The Johns Hopkins University, Baltimore, USA;
**Razi A.**, MD, Internal Medicine Department, Tehran University of Medical Sciences;
**Mojdeganlou P.**, MD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
**Dashti M.**, MD, Department of Radiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran;
**Ghasemzadeh A.**, MD, Department of Radiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran;
**Parikhani S.N.**, BS in Nursing, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
**Pashaei A.**, PhD Student, School of Nursing, University of British Columbia, Vancouver, Canada;
**Karimi A.**, MD, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
**Ahmadi S.**, MD, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran;
**Mehraeen E.**, PhD, Assistant Professor, Department of Health Information Technology, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran;
**Hackett D.**, PhD (Exercise and Sport Science), Lecturer in Discipline of Exercise and Sport Science, Sydney School of Health Sciences, Faculty of Medicine and Health, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia.

Поступила в редакцию 14.01.2023
Принята к печати 23.06.2023

Received 14.01.2023
Accepted 23.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 723–734

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 723–734

# МНОГОФАКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ НА РЕСПИРАТОРНУЮ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ У ЛЮДЕЙ РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОДОРАНТОВ С НАТОФЕРИНОМ И АНДРОФЕРИНОМ В ОТНОШЕНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА И СНИЖЕНИЯ ЧАСТОТЫ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**А.В. Бедарева[1], Е.В. Шабалдина[2], Е.А. Астафьева[2,3], А.А. Чуянова[1], А.В. Шабалдин[1]**

[1] *ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия*
[3] *Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия*

**Резюме.** Профилактика респираторных инфекций в эпидемические периоды является важной задачей современного здравоохранения России и мира. Одним из таких подходов может быть использование летучих веществ, способных активировать неспецифическую резистентность слизистой оболочки носа. Длительная аппликация синтетических аналогов женских феромонов молодым мужчинам приводит к снижению частоты респираторных заболеваний, повышению уровней секреторных иммуноглобулинов, а у лиц с аллергическими заболеваниями — к снижению уровней эозинофилии в периферической крови. Исходя из этого поставлена цель исследования — изучить влияние факторов анамнеза и показателей, отражающих функционирование мукозального иммунитета слизистой оболочки носа, ее неспецифической резистентности, на формирование частой респираторной заболеваемости; а также оценить эффективность одорантов с натоферином и андроферином в отношении динамики этих показателей и снижения частоты респираторных инфекций у молодых людей. *Материалы и методы.* Проведено обследование 46 условно здоровых юношей и девушек в возрастном интервале от 18 до 22 лет. Выполнена оценка частоты респираторной заболеваемости, факторов катамнеза и результатов проведенных неинвазивных исследований (концентрации цитокинов в назофарингеальном смыве и назоцитограммы). В течение 30 дней всем молодым людям наносились на носогубную складку синтетические аналоги мужских (андроферин) и женских (натоферин) феромонов (андроферин — девушкам, натоферин — юношам). Повторный осмотр с проведением вышеуказанных исследований проводился на 14 и 30 день

**Адрес для переписки:**
Бедарева Алена Владимировна
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Кемеровский государственный университет.
Тел.: 8 908 952-56-22.
E-mail: Leona511@mail.ru

**Contacts:**
Alena V. Bedareva
650000, Russian Federation, Kemerovo, Krasnaya st., 6,
Kemerovo State University.
Phone: +7 908 952-56-22.
E-mail: Leona511@mail.ru

**Для цитирования:**
Бедарева А.В., Шабалдина Е.В., Астафьева Е.А., Чуянова А.А., Шабалдин А.В. Многофакторное влияние на респираторную заболеваемость у людей репродуктивного возраста и эффективность одорантов с натоферином и андроферином в отношении неспецифической резистентности слизистой оболочки носа и снижения частоты респираторных инфекций // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 723–734. doi: 10.15789/2220-7619-AMI-8048

**Citation:**
Bedareva A.V., Shabaldina E.V., Astafieva E.A., Chuyanova A.A., Shabaldin A.V. A multifactorial impact on respiratory morbidity in people of reproductive age and effectiveness of natopherine- and andropherine-containing odorants regarding a non-specific resistance of the nasal mucosa and lowered morbidity of respiratory infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 723–734. doi: 10.15789/2220-7619-AMI-8048

*Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта КемГУ (соглашение № 2-ВН/2023 от 13.02.2023 г.)*
*The study was financially supported by the Kemerovo State University grant (agreement No. 2-BN/2023, 13.02.2023)*



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AMI-8048

эксперимента. Повторная оценка частоты респираторных инфекций проведена через год после начала эксперимента. *Результаты.* Проведенное исследование выявило ряд предикторов и протекторов частой и длительной респираторной заболеваемости у молодых людей. Предикторами этого состояния стали анамнестические маркеры аллергической аномалии конституции, факторы поведения (курение), а также иммунные показатели аллергии (IL-4) и дефицит мукоцилиарного клиренса. Месячный курс аппликаций на кожу носогубной складки одорантов на основе синтетических аналогов мужских и женских феромонов (стеранов) оказывает положительный эффект как на неспецифическую резистентность слизистой оболочки носа, так и на иммунные показатели ее функционирования. Через месяц применения стеранов происходит полная деконтаминация слизистых оболочек носа от кокковых микроорганизмова в течении последующих 12 месяцев снижается частота респираторных инфекций. Это указывает на значимый клинический эффект применяемых одорантов.

***Ключевые слова:*** *острые респираторные заболевания, стераны, натоферин, андроферин, иммуномодулирующий эффект, интерлейкины.*

## A MULTIFACTORIAL IMPACT ON RESPIRATORY MORBIDITY IN PEOPLE OF REPRODUCTIVE AGE AND EFFECTIVENESS OF NATOPHERINE- AND ANDROPHERINE-CONTAINING ODORANTS REGARDING A NON-SPECIFIC RESISTANCE OF THE NASAL MUCOSA AND LOWERED MORBIDITY OF RESPIRATORY INFECTIONS

**Bedareva A.V.[a], Shabaldina E.V.[b], Astafieva E.A.[b], Chuyanova A.A.[a], Shabaldin A.V.[a,b]**

[a] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation*

[b] *Kemerovo State Medical Academy of Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation*

*c Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation*

**Abstract.** Prevention of respiratory infections during epidemic periods is an important task of modern health care in Russia and worldwide. One of such approach may rely on use of volatile substances capable of activating nonspecific resistance of the nasal mucosa. Long-term application of synthetic analogues of female pheromones to young males leads to lowered morbidity of respiratory diseases, increased levels of secretory immunoglobulins, as well as decrease peripheral blood of eosinophilia levels in subjects with allergic diseases. Based on this, the aim of the study was set to study an impact of anamnesis factors and indicators reflecting the functioning of nasal mucosal immunity, its nonspecific resistance, on emerging frequent respiratory morbidity; as well as to evaluate effectiveness of natopherine- and andropherine-containing odorants regarding dynamics of such indicators and to reduce incidence of respiratory infections in young subjects. *Materials and methods.* There were examined 46 apparently healthy boys and girls aged 18 to 22 years. The frequency of respiratory morbidity, anamnesis factors, and the results of non-invasive studies (cytokine concentrations in the nasopharyngeal aspirate and rhinocytograms). Within 30 days, all young subjects were applied to the nasolabial fold synthetic analogues of male (andropherine) and female (natopherine) pheromones (andropherine — for young female, natopherine — for young male). A re-examination with the above mentioned studies was carried out on day 14 and day 30 of the study. The incidence of respiratory infections was reassessed one year after the onset. *Results.* The study showed identified a number of predictors and protectors of frequent and long-term respiratory morbidity in young subjects. The predictors of this condition were presented by catamnestics markers of allergic anomalies of the constitution, behavioral factors (smoking), as well as immune indicators of allergy (IL-4) and mucociliary clearance deficiency. A monthly course of odorant applications on the skin of the nasolabial fold using synthetic analogues of male and female pheromones (steranes) has a positive effect both on the nonspecific resistance of the nasal mucosa as well as on the immune parameters. After a month of using steranes, the nasal mucosa is completely decontaminated from coccal microorganisms, and over the next 12 months, the frequency of respiratory infections decreases. This indicates about a prominent clinical effect of the odorants applied.

***Key words:*** *acute respiratory diseases, steranes, natopherine, andropherine, immunomodulatory effect, interleukins.*

## Введение

Частая респираторная заболеваемость во взрослой популяции людей остается значимой проблемой современной медицины. Особую актуальность это явление приобрело при пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), которая, являясь высоко вирулентной, определила повышенную смертность в 2020–2021 гг. как в России, так и в мире [3]. В 2022 г. уровень респираторной инфекционной заболеваемости не снижался и был обусловлен вирусом гриппа, при котором также имела место высокая смертность от вторичных пневмоний [2, 6]. С этих позиций профилактика респираторных инфекций в эпидемические периоды является важной задачей современного здравоохранения.

В течение последних двадцати лет проведено большое количество научно-исследовательских работ, продемонстрировавших влияние половых феромонов на изменение свойств иммунной системы мелких лабораторных животных (мышей), с приобретением ими устойчивости к инфекционным агентам [6]. Было показано, что у самцов мышей, которым предъявляли запах самок, усиливался спонтанный синтез иммуноглобулинов, а также уменьшалась смертность от ранений в результате столкновений с соседями по клетке. Более того, показано, что предъявление запаха самок перед заражением самцов вирусом гриппа активирует неспецифическую иммунную реакцию, тем самым защищая самцов мышей от заражения верхних дыхательных путей и снижая их смертность [12].

Результаты ранее выполненных работ свидетельствуют о положительном эффекте воздействия половых феромонов на организм человека. В частности, показано влияние женского феромона на функциональное состояние молодых мужчин [5]. Установлено, что длительная аппликация синтетических аналогов женских феромонов молодым мужчинам приводит к снижению частоты респираторных заболеваний, повышению уровня секреторных иммуноглобулинов, а у лиц с аллергическими заболеваниями — к снижению уровня эозинофилии в периферической крови [5]. Кроме того, доказано, что женские феромоны могут оказывать значительное воздействие на эмоциональное и физическое состояние пожилых мужчин, снижая концентрацию кортизола и повышая уровень тестостерона [14].

В то же время эффект женских и мужских феромонов на состояние мукозального иммунитета носоглотки, в частности цитокинового профиля, и неспецифическую резистентность слизистой оболочки носа не исследован.

Исходя из вышесказанного была поставлена цель исследования — изучить влияние факторов анамнеза и показателей, отражающих функционирование мукозального иммунитета слизистой оболочки носа, ее неспецифической резистентности, на формирование частой респираторной заболеваемости, а также оценить эффективность одорантов с натоферином и андроферином в отношении динамики этих показателей и снижения частоты респираторных инфекций у молодых людей в возрасте от 18 до 22 лет (ранний репродуктивный период).

## Материалы и методы

Для достижения поставленной цели было проведено пилотное проспективное исследование на 46 условно здоровых юношах и девушках (расчет мощности выборки выполнен с помощью on-line калькулятора https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx), обучающихся в Кемеровском государственном университете. Возрастной интервал — от 18 до 22 лет; было обследовано 28 юношей и 18 девушек.

Все молодые люди перед началом исследования прошли анкетирование для изучения анамнеза. Анкеты включали несколько разделов, отражающих социальное поведение испытуемых, в том числе особенности питания, их медицинский и наследственный анамнез, наличие вредных привычек, а также вопросы, связанные с половым опытом и наличием постоянных сексуальных отношений.

Перед началом эксперимента от всех испытуемых были получены назофарингеальные смыва по разработанной ранее методике [7]. Также были проведены щеточная микробиопсия слизистой оболочки носа [11] и взятие образцов слюны. Повторно эти же биологические материалы забирались на 14 и на 30 день эксперимента.

В назофарингеальном смыве исследовались концентрации следующих цитокинов: интерлейкин 1 бета (IL-1β), фактор некроза опухоли альфа (TNFα), интерлейкин 4 (IL-4), интерлейкин 6 (IL-6), интерлейкин 10 (IL-10) по описанной ранее методике [1] с использованием коммерческих наборов для проведения иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Щеточная микробиопсия позволяла оценивать воспаление на слизистой оболочке носа и состояние ее функционального эпителия (рис. 1 и 2, III обложка).

На каждом этапе исследования была собрана слюна для определения гормонов (тестостерона и эстрадиола). Образцы слюны были центрифугированы на скорости 3000 об/мин в течение 15 мин. По 1 мл каждого образца помещалось в пробирки типа эппендорф и хранилось при температуре –20°С. В образцах иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора («Стероид ИФА-эстрадиол» и «Стероид ИФА-тестостерон», Хема-Медика, Россия), обладающего достаточной чувствительностью, определяли содержание тестостерона и эстрадиола. Особенности исследования тестостерона и эстрадиола в слюне описаны ранее [5].

Для изучения воздействия половых феромонов противоположного пола юношам в течение месяца предъявляли натоферин, девушкам — андроферин. Натоферин является коммерциализированным синтетическим аналогом женского феромона копулина (номер свидетельства о регистрации 449477), изготовленного европейской лабораторией и распространяемого на территории России фирмой Parfume-Prestige M (ООО «АртБьюти»). В соответствии с информацией, представляемой компаниями, данное вещество состоит преимущественно из производных изовалериановой

и масляной кислот [13]. Андроферин — синтетический аналог мужского полового феромона андростенона (номер свидетельства о регистрации 449476). Согласно этим регистрационным свидетельствам, данные продукты могут длительно наноситься на кожу человека.

В ходе исследования молодые люди наносили ежедневно на поверхность кожи над верхней губой раствор синтетического феромона и дипропиленгликоля в концентрации, рекомендованной производителем (0,12% раствор), в течение одного месяца.

Учет частоты респираторных заболеваний был выполнен за 1 год до начала эксперимента и через 1 год после его окончания. Согласно данным клинических рекомендаций респираторную заболеваемость считали частой при повторении ОРВИ 4 и более раза в год.

Статистическая обработка данных проводилась в пакетах программ Statistica for Windows» фирмы StatSoft Inc., версия 10.0, и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики. Для поиска предикторов частой респираторной заболеваемости была использована логистическая пошаговая регрессия (статистический метод классификации с использованием линейного дискриминанта Фишера). Зависимой переменной была частота респираторных инфекций за 1 год (от 0 до 10 случаев), а независимыми переменными — все пункты анкеты (социальные, наследственные, медицинские факторы, а также концентрации цитокинов в назофарингеальном смыве, результаты щеточной микробиопсии слизистой оболочки носа). Коэффициенты, полученные для выявленных значимых предикторов и протекторов, указывали на степень ассоциации с частой респираторной заболеваемостью, а знак (– или +) перед переменной указывал на положительную или отрицательную связь. Положительная связь показывала, что фактор является предиктором частой респираторной заболеваемости, отрицательная указывала на его протективность. Полученная при этом анализе логистическая функция с весовыми коэффициентами для каждого предиктора отражает взаимодействие и интегральное влияние сочетания факторов в реализации эффекта. Эффективность логистической функции оценивалась по показателю площади под кривой (AUC) из ROC-анализа ставшего, фактически, стандартом для оценки качества бинарной классификации. Поиск логистических функций выполнен как для частой респираторной заболеваемости до начала эксперимента, так и через 1 год после его завершения. Для сравнения отдельных показателей в трех точках исследования (до начала, на 14 и 30 день эксперимента) использовали U-критерий Манна–Уитни (имелось асимметричное распределение). Количественные данные были представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го процентилей (P25 и P75). Вероятность ошибки первого рода была принята за 5%, второго рода — за 20%, уровень статистической значимости выявлялся при $p < 0,05$, что соответствует стандартным требованиям.

## Результаты и обсуждение

Проведенная пошаговая логистическая регрессия для зависимого фактора — частота ОРВИ за один год, и независимых переменных — анамнеза, иммунных и цитологических показателей, отражающих регуляцию мукозального иммунитета и неспецифической резистентности слизистой оболочки носа — показала ряд положительных и отрицательных ассоциаций, которые совместно определяют частую респираторную заболеваемость (табл. 1). Необходимо отметить, что полученные в классификаторе β-коэффициенты отражают относительное влияние предиктора на зависимую переменную, а B-коэффициенты показывают прогностическую значимость предиктора и могут быть использованы в уравнении, описывающем логистическую функцию. Кроме того, можно оценивать и влияние отдельных предикторов (со знаком «+» или в таблице просто без знака перед коэффициентом) и протекторов (со знаком «–») на частоту респираторной заболеваемости у лиц раннего репродуктивного периода.

Как видно из табл. 1, значимыми предикторами повторяющихся респираторных инфекций являлись возраст обследованных, наличие у них в анамнезе обструктивных бронхитов, ларингитов, атопических дерматитов, курения и перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19. Из лабораторных показателей предикторами оказались выраженность лейкоцитарных реакций по данным назоцитограммы (щеточная микробиопсия слизистой оболочки носа), удельный вес плоского нефункционального эпителия по назоцитограмме, а также концентрации TNFα и IL-4 в назофарингеальном смыве. Эти результаты вполне логичны и указывают на тот факт, что частая респираторная заболеваемость формируется на фоне аллергического эндотипа или аллергической аномалии конституции (термин используется в отечественной медицине), при которой имеют место стенозирующие ларингиты, обструктивные бронхиты, атопические дерматиты и повышение уровня IL-4. С другой стороны, эти молодые люди имеют сниженную неспецифическую резистентность слизистой оболочки носа, отраженную в высоком удельном весе у них нефункционального плоского эпителия (рис. 2Б,

III обложка). Кроме того, выраженность лейкоцитарных реакций по данным щеточной микробиопсии слизистой оболочки носа указывает на гиперреактивность мукозального клеточного иммунитета, в том числе за счет клеточного типа аллергических реакций, о чем указывает и повышенный синтез преимущественно клетками слизистой оболочки носа TNFα.

Отрицательно ассоциированными с частой респираторной заболеваемостью были мужской пол, а также цитологические и иммунологические показатели слизистой оболочки носа, представленные в табл. 1. Как видно из таблицы, это были показатели назоцитограммы: выраженность и удельный вес цилиндрического эпителия (рис. 2А, III обложка), удельный вес нейтрофильный лейкоцитов и лимфоцитов, а также выраженность эксудативных реакций. Это результаты также вполне объяснимы. Так, в исследовании участвовали обучающиеся уни-

**Таблица 1. Результаты логистической регрессии с зависимым фактором (частота ОРВИ за 1 год) и независимыми переменными анамнеза и показателей слизистой оболочки носа на момент начала наблюдения**

Table 1. The results of logistic regression with a dependent factor, a one-year morbidity of acute respiratory viral infections and independent variables of catamnesis as well as nasal mucosa indicators at the onset of observation

| **Независимые переменные**<br>Independent variables | β | Std. Err β | B | Std.Err B | p-level |
|---|---|---|---|---|---|
| **Отрезок**<br>Section | | | **0,376** | 0,056 | 0,005 |
| **Возраст**<br>Age | 0,154 | 0,002 | **0,210** | 0,003 | 0,010 |
| **Обструктивный бронхит, ларингит в анамнезе**<br>Obstructive bronchitis, laryngitis in history | 0,680 | 0,002 | **3,818** | 0,009 | 0,002 |
| **Атопический дерматит в анамнезе**<br>Atopic dermatitis in history | 1,029 | 0,003 | **8,004** | 0,023 | 0,002 |
| **Удельный вес лимфоцитов в NCG**<br>Lymphocyte percentage in the NCG | −0,172 | 0,003 | −1,336 | 0,020 | 0,009 |
| **Удельный вес нейтрофилов**<br>NCG neutrophil percentage | −0,660 | 0,004 | −0,024 | 0,000 | 0,004 |
| **Концентрация IL-10 в НФС**<br>IL-10 concentration in NPS | − 0,814 | 0,005 | − 0,969 | 0,005 | 0,004 |
| **Концентрация TNFα в НФС**<br>TNFα concentration in NPS | 0,245 | 0,004 | **0,452** | 0,008 | 0,011 |
| **Удельный вес цилиндрического эпителия в NCG**<br>Percentage of cylindrical epithelium in NCG | −0,917 | 0,003 | −0,050 | 0,000 | 0,002 |
| **Выраженность лейкоцитарных реакций в NCG**<br>Magnitude of leukocyte reactions in NCG | 0,209 | 0,004 | **0,478** | 0,009 | 0,012 |
| **Концентрация IL-1 в НФС**<br>IL-1 concentration in NPS | −0,631 | 0,003 | −0,480 | 0,002 | 0,003 |
| **Концентрация IL-4 в НФС**<br>IL-4 concentration in NPS | 0,801 | 0,003 | **0,407** | 0,002 | 0,002 |
| **Выраженность экссудативных реакций в NCG**<br>Magnitude of exudative reactions in NCG | −0,677 | 0,003 | −1,545 | 0,008 | 0,003 |
| **Перенесенный COVID-19**<br>Convalescent COVID-19 | 0,449 | 0,002 | **1,343** | 0,007 | 0,003 |
| **Удельный вес плоского эпителия в NCG**<br>Percentage of squamous epithelium in NCG | 0,614 | 0,004 | **0,074** | 0,000 | 0,004 |
| **Выраженность цилиндрического эпителия в NCG**<br>Magnitude of cylindrical epithelium in NCG | −0,313 | 0,003 | −0,670 | 0,006 | 0,005 |
| **Курение**<br>Smoking | 0,282 | 0,005 | **0,466** | 0,008 | 0,011 |
| **Пол (женский 2 балла, мужской 1 балл)**<br>Gender (female 2 points, male 1 point) | −0,128 | 0,004 | −0,399 | 0,013 | 0,021 |

**Примечание.** Представлены только значимые ассоциации. NCG — назоцитограмма; НФС — назофарингеальный смыв; B-коэффициенты, выделенные жирным шрифтом, отражают предикторные свойства переменной; B-коэффициенты, не выделенные жирным шрифтом, отражают протекторные свойства переменной.

Note. Only significant associations are presented. NCG — nasocytogram; NPS — nasopharyngeal smear; B-coefficients highlighted in bold reflect the predictor properties of the variable; B-coefficients in regular reflect the protective properties of the variable.

верситета, которые постоянно находятся в больших коллективах и имеют высокую антигенную нагрузку на слизистую оболочку носа и всего респираторного тракта. В то же время, благодаря активному функционированию мерцательного эпителия, развитию эксудативных и клеточных реакций они защищены от повторения респираторных инфекций.

Из табл. 1 также видно, что особое значение в протекции респираторных инфекций имеют IL-10 и IL-1, синтезируемыми, преимущественно, лимфоидными и эпителиальными клетками слизистой оболочки носа. Согласно классификации функциональности цитокинов IL-10 относится в противовоспалительным интерлейкинам, а IL-1 — к провоспалительным. β-коэффициент, отражающий относительное влияние предиктора на зависимую переменную, был по модальному показателю значимо выше у IL-10, чем у IL-1. Таким образом, противовоспалительные цитокина доминировали над провоспалительными и, возможно, влияли на них.

Линейный регрессионный анализ позволяет оценивать сочетанное влияние всех выявленных предикторов и протекторов на зависимую переменную, в частности на частоту респираторных инфекций. Это совокупное влияние описывается логистическим уравнением,

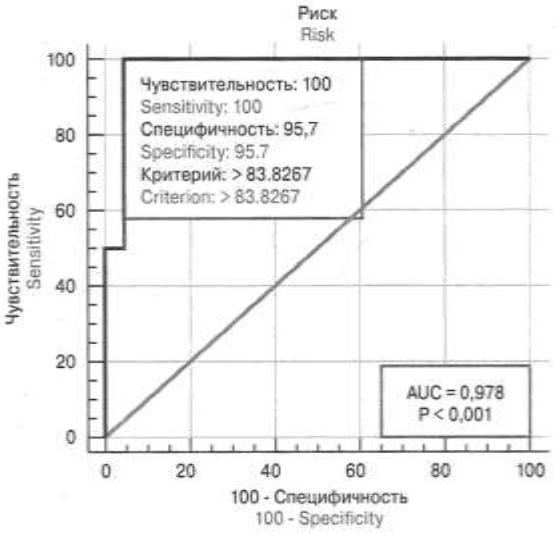


**Рисунок 3. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для оценки комплексного влияние предикторов и протекторов на частоту респираторных инфекций у лиц раннего репродуктивного возраста по показателю AUC**

Figure 3. ROC-analysis assessing effectiveness of the logistic function to analyze a multi-prong effect of predictors and protectors on morbidity of respiratory infections in subjects of early reproductive age by using AUC

где в формуле используются B-коэффициенты каждого значимого предиктора и протекторы.

В данном случае уравнение расчета комплексного влияния факторов катамнеза, цитологических и иммунологических показателей слизистой оболочки носа на формирование частой респираторной заболеваемости у лиц раннего репродуктивного возраста представлено следующей формулой:

$$Y = (EXP(Z)/(1 + EXP(Z))) \times 100\%,$$

где $Z = (0{,}38+0{,}21 \times X_1+3{,}82 \times X_2+8{,}01 \times X_3-1{,}34 \times X_4-0{,}02 \times X_5+0{,}97 \times X_6+0{,}42 \times X_7-0{,}05 \times X_8+0{,}48 \times X_9-0{,}48 \times X_{10}+0{,}41 \times X_{11}-1{,}55 \times X_{12}+1{,}34 \times X_{13}+0{,}07 \times X_{14}-0{,}67 \times X_{15}+0{,}47 \times X_{16}-0{,}41 \times X_{17})$; Y — комплексное влияние на формирование частой респираторной заболеваемости у людей раннего репродуктивного возраста (в %); $X_1$ — возраст человека (в годах); $X_2$ — обструктивный бронхит и ларингит в анамнезе (0 — нет, 1 — есть); $X_3$ — атопический дерматит в анамнезе (0 — нет, 1 — есть); $X_4$ — удельный вес лимфоцитов по NCG (%); $X_5$ — удельный вес нейтрофилов по NCG (%); $X_6$ — концентрация IL-10 по НФС (пг/мл); $X_7$ — концентрация TNFα по НФС (пг/мл); $X_8$ — удельный вес цилиндрического эпителия по NCG (%); $X_9$ — выраженность лейкоцитарных реакций по NCG (0, 1, 2, 3 — балла); $X_{10}$ — концентрация IL-1 по НФС (пг/мл); $X_{11}$ — концентрация IL-4 по НФС (пг/мл); $X_{12}$ — выраженность эксудативных реакций по NCG (0, 1, 2, 3 — балла); $X_{13}$ — COVID-19 в анамнезе (0 — нет, 1 — есть); $X_{14}$ — удельный вес плоского эпителия по NCG (%); $X_{15}$ — выраженность цилиндрического эпителия по NCG (0, 1, 2, 3 — балла); $X_{16}$ — курение (0 — нет, 1 — есть); $X_{17}$ — пол (1 — мужской, 2 — женский).

Как видно из уравнения, вклад предикторов и протекторов в формирование частой респираторной заболеваемости в раннем репродуктивном периоде можно оценить с использованием сбора анамнеза, а также дополнительных исследований цитокинов в НФС и назоцитограммы.

Необходимо пояснить, что логарифмический характер управления говорит о том, что если коэффициент стремится к 50%, то риск сохранения частой респираторной заболеваемости равновероятен; если коэффициент стремится к нулю, то риск дальнейшего прогрессирования частых ринитов и фарингитов маловероятен; и, наоборот, при коэффициентах, близких к 100%, риск развития этой патологии у лиц раннего репродуктивного периода становится высоким. Оценка эффективности уравнения была выполнена в ROC-анализе (рис. 3), который показал высокую специфичность и чувствительность.

Тем самым многофакторный анализ анамнеза, цитоморфологических и иммунных показателей слизистой оболочки носа выявил ряд предикторов частой и длительной респираторной заболеваемости у молодых людей раннего репродуктивного периода. Предикторами явились анамнестические маркеры аллергической аномалии конституции (атопический дерматит, обструктивный бронхит и стенозирующий ларингит), факторы поведения (курение), а также иммунные показатели аллергии (IL-4) и дефицита мукоцилиарного клиренса (высокий удельный вес плоского нефункционального эпителия).

На следующем этапе исследования было проведено изучение роли одорантов натоферина (синтетический аналог женского феромона копулина) и андроферина (синтетический аналог мужского феромона андростендиона) в отношении неспецифической резистентности слизистой оболочки носа и снижения частоты респираторных инфекций.

Эти соединения имеют стерановый каркас и являются летучими метаболитами стероидных гормонов. Они могут взаимодействовать с большой группой рецепторов к стеранам, в том числе на клетках слизистой оболочки носа, и оказывать плейотропное влияние на общее состояние здоровья и локальную резистентность. Соответствующие одоранты (женские — юношам и мужские — девушкам) наносились шариковым дезодорантом в виде одной полоски на кожу носогубной складки в течении 30 дней. За это время ни у одного из обследованных не было проявлений локального дерматита и изменения пигментации кожи.

Сравнение цитологических и иммунологических показателей слизистой оболочки носа до начала эксперимента, на 14 и на 30 день показало значимые изменения, представленные в табл. 2.

Как видно из табл. 2, через 30 дней эксперимента у обследованных значимо увеличился удельный вес цилиндрического функционального мерцательного эпителия и значимо уменьшался удельный вес плоского нефункционального эпителия от начала эксперимента к 14 и 30 дням . Эти данные показывают увеличение клеток эпителия, участвующих в эффективном мукоцилиарном клиренсе и, тем самым, отражают увеличение неспецифической резистентности слизистой оболочки

**Таблица 2. Сравнение показателей, отражающих резистентность слизистой оболочки носа до начала наблюдения, в течение его и после его окончания**

Table 2. Comparison of indicators reflecting resistance of the nasal mucosa before, during and after observation

| Показатели | Начало эксперимента Onset of study | | | 14 день эксперимента Day 14 | | | Окончание эксперимента (30 день) End of study | | | $P_{1,2}$ | $P_{1,3}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Me | P25 | P75 | Me | P25 | P75 | Me | P25 | P75 | | |
| **Удельный вес цилиндрического эпителия по NCG, %** Percentage of cylindrical epithelium in NCG, % | 86,07 | 58,38 | 113,77 | 83,44 | 47,82 | 119,08 | 94,82 | 75,74 | 113,89 | 0,31 | **0,04** |
| **Удельный вес плоского эпителия по NCG, %** Percentage of the squamous epithelium in NCG, % | 6,52 | −5,94 | 18,97 | 1,74 | −1,73 | 5,21 | 1,48 | −0,73 | 3,69 | **0,04** | **0,03** |
| **Удельный вес нейтрофилов по NCG, %** Percentage of neutrophils in NCG, % | 21,82 | −19,79 | 63,42 | 29,59 | −16,88 | 76,07 | 44,37 | −6,18 | 94,92 | 0,09 | **0,001** |
| **Концентрация IL-6 по НФС, пг/мл** IL-6 concentration according to NPS, pg/ml | 2,53 | −0,89 | 5,95 | 3,17 | −9,01 | 15,36 | 1,07 | −1,30 | 4,63 | 0,57 | **0,04** |
| **Концентрация IL-10 по НФС, пг/мл** IL-10 NPS concentration, pg/ml | 3,199 | 1,943 | 4,456 | 3,592 | 0,620 | 6,564 | 4,029 | −0,582 | 8,388 | 0,482 | **0,047** |

**Примечание.** Представлены только показатели, для которых получено хотя бы одно значимое различие с показателем в начале наблюдения. NCG — назоцитограмма; НФС — назофарингеальный смыв; жирным шрифтом выделены значимые различия.

Note. Only indicators for which at least one significant difference was obtained at the onset of observation are presented. NCG — nasocytogram; NPS — nasopharyngeal flush; significant differences are highlighted in bold.

носа у лиц, применяющих одоранты на основе синтетических аналогов феромонов.

Другие значимые изменения по данным назоцитограммы касались удельного веса нейтрофилов в лейкоцитарной формуле: их количество увеличилось к 30 дню эксперимента. Первый этап исследования показал, что удельный вес нейтрофилов в назоцитограмме является протектором частой респираторной заболеваемости у молодых людей в больших коллективах. Тем самым увеличение этих иммунных клеток после месячного воздействия одорантов на основе синтетических аналогов феромонов является проявлением усиления врожденного клеточного иммунитета слизистой оболочки носа.

Особо необходимо отметить изменения концентрации интерлейкинов назофарингеального смыва за один месяц эксперимента. Так, уровень IL-6 в назофарингеальном смыве через 30 дней после начала нанесения одоранта значимо снизился, а концентрация IL-10, напротив, увеличилась. Выше указывалось, что по своим доминирующим функциональным свойствам IL-6 относится к провоспалительным цитокинам, а IL-10 — к противовоспалительным. Соответственно месячное воздействие синтетических аналогов феромонов (стеранов) на слизистую оболочку носа снижает ее провоспалительный потенциал и, напротив, повышает противовоспалительный.

В табл. 3 представлены результаты непараметрического сравнения с помощью критерия хи-квадрат частоты респираторной заболеваемости за один год до эксперимента и через 1 год после него.

Как уже отмечалось в разделе «Материалы и методы», критерием частой респираторной заболеваемости было принято количество 4 раза за один год. Так, к частоболеющим людям относили тех обследованных, у которых частота респираторных эпизодов была больше 4 за 12 месяцев. Анализ по этому критерию показал, что через 1 год в исследуемой группе не было ни одного часто и длительно болеющего молодого человека (юношей и девушек).

Другими критериями, по которым проводилась оценка с помощью критерия хи-квадрат, были наличие кокковой микрофлоры в назоцитограмме и ее проявление, оцененное в баллах. Как видно из табл. 3, после окончания эксперимента ни у одного из испытуемых кокковая микрофлоры в назоцитограммах не обнаруживалась. Это указывает на значимый асептический эффект одорантов на основе синтетических аналогов феромонов человека.

Таким образом, можно говорить о том, что месячный курс нанесения на кожу носогубной складки одорантов на основе синтетических аналогов мужских и женских феромонов (стеранов) оказывает положительный эффект как на неспецифическую резистентность слизистой оболочки носа (увеличение удельного веса мерцательного функционального эпителия и уменьшение процента плоского эпителия), так и на иммунные показатели в ее функционировании (увеличение уровня нейтрофильных лейкоцитов в назоцитограмме, концентрации в назофарингеальном смыве противовоспалительного IL-10 и, напротив, снижение концентрации провоспалительного IL-6). Кроме того, через месяц применения данных одорантов происходит полная деконтаминация слизистых оболочек носа от условно-патогенных

**Таблица 3. Сравнение показателей экспрессии микрофлоры и процента часто болеющих людей до начала наблюдения и после него**

Table 3. Comparison of microflora expression indicators and the percentage of frequently ill people before and after observation

| Параметр | До эксперимента | | После эксперимента | | P |
|---|---|---|---|---|---|
| | **абс.**/abs. | % | **абс.**/abs. | % | |
| **Часто болеющие лица (0 — болеет ОРВИ не часто, 1 — болеет ОРВИ часто)**<br>Frequently ill persons (0 — SARS is not often ill, 1 — SARS is often ill) | 4 | 14,81 | 0 | 0 | **0,038** |
| **Наличие кокковой флоры по NCG (0 — не обнаружена, 1 — обнаружена)**<br>Presence of coccoid flora according to NCG (0 — not detected, 1 — detected) | 4 | 14,81 | 0 | 0 | **0,038** |
| **Выраженность кокковой флоры по NCG (0 — отсутствует, 1 — присутствует незначительно, 2 — присутствует значительно, 3 — выраженное присутствие, сплошь)**<br>The severity of coccal flora according to NCG (0 — absent, 1 — slightly present, 2 — significantly present, 3 — pronounced presence, entirely) | 10 | 12,35 | 0 | 0 | **0,047** |

**Примечание.** Частая респираторная заболеваемость (более 4 раз в год) оценивалась через 1 год после окончания эксперимента. NCG — назоцитограмма; жирным шрифтом выделены значимые различия.

Note. Frequent respiratory morbidity (more than 4 times a year) was assessed 1 year after the end of the study. NCG — nasocytogram; significant differences are highlighted in bold.

микроорганизмов коккового фенотипа. И наконец в течении 12 месяцев после эксперимента частота респираторных инфекций у всех обследованные была ниже 4 раз. Это указывает на значимый клинический эффект применяемых одорантов. Также в эксперименте не было ни одного обследованного с проявлениями дерматита и изменениями пигментации на участках аппликации одоранта.

На заключительном этапе исследования была проведена оценка с помощью пошаговой логистической регрессии вклада факторов анамнеза, а также цитологических и иммунных показателей (в трех точках эксперимента), в динамику респираторных заболеваний до начала эксперимента и через один год после его завершения (табл. 4).

Данные, представленные в табл. 4, необходимо трактовать следующим образом. Положительное значение указывает на существенный вклад параметра в уменьшение числа ОРВИ за один год (ассоциирован с большой разницей между первичной частотой ОРВИ и частотой ОРВИ при повторной оценке), а отрицательное значение отражает протекторные свойства фактора, выражающиеся в уменьшении количества ОРВИ через 1 год после эксперимента. Также надо отметить, что все эти предикторы и протекторы снижения числа ОРВИ необходимо интерпретировать с позиции месячного воздействия на слизистую оболочку носа одорантов на основе синтетических аналогов феромонов человека.

Как видно из табл. 4, такие ранее проявленные факторы катамнеза, как атопический дерматит, обструктивный бронхит и стенозирующий ларингит в анамнезе, были предикторами снижения частоты респираторных инфекций у молодых людей, получавших аппликации синтетических аналогов феромонов человека. И хотя эти факторы были предикторами частой респираторной заболеваемости, они же проявились и в чувствительности к ее снижению под воздействием исследуемых аппликационных одорантов.

Значимое положительное влияние на снижение частоты респираторных инфекций после месячного курса натоферином и андроферином оказывало повышение к 14 дню аппликаций удельного веса мерцательного функционального цилиндрического эпителия и нейтрофильных лейкоцитов.

Необходимо отметить повышение к окончанию эксперимента TNFα в назофарингеальном смыве как предиктора снижения частоты респираторных заболеваний через 1 год. Эти результаты требуют дальнейшего изучения, но вполне вероятно, что именно этот цитокин, совместно с нейтрофильными лейкоцитами, усиливает противобактериальную и антивирусную защиту.

Другим важным результатом является положительная ассоциация высоких концентраций тестостерона к моменту окончания эксперимента со значимым снижением частоты респираторных инфекций у молодых лиц через 1 год после аппликации атоферина и андроферина. Об ассоциациях между повышением тестостерона и снижением респираторных заболеваний неоднократно сообщалось различными исследовательскими группами [5, 10, 15]. Возможно, что активация противовирусной защиты в настоящем исследовании также была связана с повышением тестостерона.

Показателями, которые значимо тормозили уменьшения частоты респираторной заболеваемости через один год после эксперимента, были такие факторы анамнеза, как использование парфюмерии и наличие пищевых предпочтений. Эти результаты могут отражать негативное влияние парфюмерии на слизистую оболочку носа и дефицит витаминов и микроэлементов при ограничении пищевого рациона.

Дефицит функционального мерцательного цилиндрического эпителия при начале эксперимента является протектором в уменьшении частоты респираторных заболеваний. Это еще раз указывает на значимость этого показателя назоцитограммы. Тот факт, что исследуемые стераны влияют именно на этот показатель, определяет их значимость в профилактике ОРВИ и повышении неспецифической резистентности слизистой оболочки носа.

Одними из протекторов ограничения респираторной заболеваемости у лиц молодого возраста являются высокий удельный вес эозинофильных лейкоцитов (по данным назоцитограммы) и повышенная концентрация IL-1 в назофарингеальном смыве на момент окончания эксперимента. Эти данные еще раз подтверждают, что отдельные типы конституционально закрепленных аллергических реакций (клеточный тип) могут поддерживать повторение респираторных заболеваний [9].

По схожей патогенетической схеме реализуется протекторный эффект высоких концентраций провоспалительного цитокина IL-6 [8, 15] в назофарингеальном смыве в начале эксперимента на снижение частоты респираторной заболеваемости у лиц раннего репродуктивного периода.

Таким образом, умеренная респираторная заболеваемость поддерживается особенностями иммунной конституции молодых людей (склонность к аллергическим реакциям, прежде всего по клеточному типу, высокий первичный провоспалительный потенциал слизистой оболочки носа), а также поведенческие факторы (использование косметики, наличие пищевых предпочтений).

**Таблица 4. Результаты логистической регрессии с зависимым фактором изменения частоты ОРВИ до наблюдения и через 1 год после него и всеми независимыми переменными анамнеза и исследования показателей слизистой оболочки носа (представлены только значимые ассоциации)**

Table 4. Results of logistic regression with a dependent factor frequency dynamics of ARVI before and 1 year after observation and all independent variables of catamnesis and examination of nasal mucosa indicators (only significant associations are presented)

| Независимые переменные | β | Std. Err. β | B | Std. Err. B | p-level |
|---|---|---|---|---|---|
| **Отрезок**<br>Section | | | **4,049** | **0,175** | **0,000** |
| **Удельный вес цилиндрического эпителий по NCG на 14 день наблюдения**<br>The percentage of cylindrical epithelium in NCG on day of observation | **0,211** | **0,016** | **0,017** | **0,001** | **0,000** |
| **Атопический дерматит в анамнезе**<br>Atopic dermatitis in history | **0,591** | **0,016** | **4,608** | **0,129** | **0,000** |
| **Удельный вес эозинофилов по NCG на момент окончания наблюдения**<br>Percentage of eosinophils by NCG at the end of observation | −0,356 | 0,017 | −1,387 | 0,066 | 0,000 |
| **Удельный вес цилиндрического эпителия по NCG на момент начала наблюдения**<br>The percentage of the cylindrical epithelium according to the NCG at the time of the start of observation | −0,457 | 0,013 | −0,025 | 0,001 | 0,000 |
| **Избирательность в пище**<br>Selectivity in food | −0,373 | 0,015 | −0,681 | 0,028 | 0,000 |
| **Использование парфюмерии**<br>The use of perfumes | −0,391 | 0,023 | −1,233 | 0,074 | 0,000 |
| **Концентрация IL-1 в НФС на момент окончания наблюдения**<br>IL-1 concentration in NPS at the end of observation | −0,450 | 0,025 | −0,432 | 0,024 | 0,000 |
| **Удельный вес плоского эпителия по NCG на момент начала наблюдения**<br>Percentage of the squamous epithelium in NCG at the onset of observation | −0,374 | 0,015 | −0,045 | 0,002 | 0,000 |
| **Концентрация тестостерона после окончания наблюдения**<br>Concentration of testosterone after the end of observation | **0,338** | **0,023** | **0,700** | **0,047** | **0,000** |
| **Концентрация IL-6 по НФС на момент начала наблюдения**<br>IL-6 concentration according to NPS at the time of the start of observation | −0,081 | 0,019 | −0,037 | 0,009 | 0,002 |
| **Обструктивный бронхит и ларингит в анамнезе**<br>Obstructive bronchitis and laryngitis in history | **0,250** | **0,026** | **1,409** | **0,144** | **0,000** |
| **Удельный вес нейтрофилов по NCG на 14 день наблюдения**<br>Percentage of neutrophils in NCG on day 14 of observation | **0,124** | **0,025** | **0,004** | **0,001** | **0,001** |
| **Выраженность цилиндрического эпителия по NCG на 14 день наблюдения**<br>Magnitude of cylindrical epithelium in NCG on day 14 of observation | **0,209** | **0,021** | **0,371** | **0,036** | **0,000** |
| **Концентрация TNFα в НФС на момент окончания наблюдения**<br>TNFα concentration in NPS at the end of observation | **0,125** | **0,020** | **0,067** | **0,011** | **0,000** |

**Примечание.** NCG — назоцитограмма; НФС — назофарингеальный смыв; B-коэффициенты, выделенные жирным, отражают предикторные свойства переменной; B-коэффициенты, не выделенные жирным, отражают протекторные свойства переменной.

Note. NCG — nasocytogram; NPS — nasopharyngeal smear; B-coefficients highlighted in bold reflect the predictor properties of the variable; B-coefficients in regular reflect the protective properties of the variable.

## Заключение

Таким образом, многофакторный анализ катамнеза, цитоморфологических и иммунных показателей слизистой оболочки носа выявил ряд предиктором и протекторов частой и длительной респираторной заболеваемости у молодых людей раннего репродуктивного периода. Предикторами этого состояния явились катамнестические маркеры аллергической аномалии конституции (атопический дерматит, обструктивный бронхит и стенозирующий ларингит), факторы поведения (курение), а также иммунные показатели аллергии (IL-4) и дефицита мукоцилиарного клиренса (высокий удельный вес плоского нефункционального эпителия).

Месячный курс нанесения на кожу носогубной складки одорантов на основе синтетических аналогов мужских и женских феромонов (стеранов) оказывает положительный эффект как на неспецифическую резистентность слизистой оболочки носа (увеличение удельного веса мерцательного функционального эпителия и уменьшение процента плоского эпителия), так и на иммунные показатели ее функционирования (увеличение уровня нейтрофильных лейкоцитов в назоцитограмме, концентрация в назофарингеальном смыве противовоспалительного IL-10 и, напротив, снижение концентрации провоспалительного IL-6). Кроме того, через месяц применения данных одорантов происходит полная деконтаминация слизистых оболочек носа от условно-патогенных микроорганизмов коккового фенотипа, а в течении последующих 12 месяцев частота респираторных заболеваний у молодых людей значимо снижается. Это указывает на выраженный клинический эффект применяемых одорантов.

На снижение частоты респираторных инфекций после месячного курса одорантами на основе синтетических аналогов мужских и женских феромонов отрицательно влияют: особенности иммунной конституции молодых людей, склонность к аллергическим реакциям по клеточному типу, высокий первичный провоспалительный потенциал на слизистой оболочке носа, а также поведенческие факторы (использование косметики, наличие пищевых предпочтений).

## Список литературы/References


1. Ахтямов Д.Р., Шабалдина Е.В., Гривцова С.В., Апалько С.В., Шабалдин А.В. Иммуномодулирующий эффект аденотомии у детей раннего и дошкольного возраста с высокими степенями гипертрофии глоточной миндалины и повторяющимися назофарингитами // Российская оториноларингология. 2022. Т. 21, № 1. С. 27–41. [Akhtyamov D.R., Shabaldina E.V., Grivtsova S.V., Apal'ko S.V., Shabaldin A.V. Immunomodulatory effect of adenoidectomy in infants and preschool children with high degrees of adenoid hypertrophy and recurrent nasopharyngitis. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology, 2022, vol. 21, no. 1, pp. 27–41. (In Russ.)*] *doi: 10.18692/1810-4800- 2022-1-27-41*
2. Гольдштейн Э.М. Факторы, влияющие на смертность от новой коронавирусной инфекции в разных субъектах Российской Федерации [Gol'dshtein E.M. Factors affecting mortality from a new coronavirus infection in different regions of the Russian Federation] *COVID19-preprints.microbe.ru. 2020. doi: 10.21055/preprints-3111909*
3. Данилова И.А. Заболеваемость и смертность от COVID-19. Проблема сопоставимости данных // Демографическое обозрение. 2020. Т. 7, № 1. С. 6–26. [Danilova I.A. Morbidity and mortality from COVID-19. The problem of data comparability. *Demograficheskoe obozrenie = Demographic Review, 2020, vol. 7, no. 1, pp. 6–26. (In Russ.)*] *doi: 10.17323/demreview.v7i1.10818*
4. Капранов С.В., Фролова Е.С., Округин Ю.А., Тарабцев Д.В. Оценка связи заболеваемости населения острыми респираторно-вирусными инфекциями, пневмониями, COVID-19 и смертности от COVID-19 и пневмоний // Экологический вестник Донбасса. 2022. № 6. С. 9–18. [Kapranov S.V., Frolova E.S., Okrugin Yu.A., Tarabtsev D.V. Assessment of the relationship between the incidence of acute respiratory viral infections, pneumonia, COVID-19 and mortality caused by COVID-19 and pneumonia. *Ekologicheskii vestnik Donbassa = Ecological Bulletin of Donbass, 2022, no. 6, pp. 9–18. (In Russ.)*]
5. Литвинова Н.А., Бедарева А.В., Зубрикова К.Ю. Влияние женского феромона на функциональное состояние молодых мужчин // Acta Biomedica Scientifica. 2019. Т. 4, № 1. С. 50–58. [Litvinova N.A., Bedareva A.V., Zubrikova K.Yu. The effect of female pheromone on the functional state of young men. *Acta Biomedica Scientifica, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 50–58. (In Russ.)*] *doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.8*
6. Мошкин М.П., Герлинская Л.А., Евсиков В.И. Иммунная система и реализация поведенческих стратегий размножения при паразитарных прессах // Журнал общей биологии. 2003. Т. 64, № 1. С. 23–44. [Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. The role of the immune system in behavioural strategies of reproduction under parasitic pressure. *Zhurnal obshchei biologii = Biology Bulletin Reviews, 2003, vol. 64, no. 1, pp. 23–44. (In Russ.)*]
7. Патент № 2013146333 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Способ определения провоспалительных и проаллергических интерлейкинов в назальном секрете у детей раннего и дошкольного возраста для диагностики этиологии рецидивирующих острых ринофарингитов и аденоидитов: № 2013146333/15; заявлено 16.10.2013: опубликовано 20.11.2015 / Тюменев А.В., Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Симбирцев А.С., Рязанцев С.В. Патентообладатель: Тюменев А.В., Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Симбирцев А.С., Рязанцев С.В. 11 с. [Patent No. 2013146333 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/48 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Method of determining proinflammatory and proallergic interleukins in nasal secretion in infants and preschool children for diagnostics of aetiology of recurring acute rhinopharyngitis and adenoiditis. No. 2013146333/15; application: 16.10.2013: date of publication 20.11.2015 / Tjumenev A.V., Shabaldina E.V., Shabaldin A.V., Simbirtsev A.S., Rjazantsev S.V. Proprietors: Tjumenev A.V., Shabaldina E.V., Shabaldin A.V., Simbirtsev A.S., Rjazantsev S.V. 11 p.]

8. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3, № 2. С. 16–22. [Simbirtsev A.S. Cytokines: classification and biological functions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation, 2004, vol. 3, no. 2, pp. 16–22. (In Russ.)*]
9. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18, № 1. С. 84–95. [Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 84–95. (In Russ.)*] *doi: 10.20538/1682-0363-2019-1-84-95*
10. Суринов Б.П., Исаева В.Г., Карпова Н.А. Иммуностимулирующая хемосигнализация у животных при вторичных иммунодефицитных состояниях // Доклады Академии наук. 2008. Т. 418, № 2. С. 282–285. [Surinov B.P., Isaeva V.G., Karpova N.A. Immune stimulating chemosignalling system in animals with secondary immune deficiency. *Doklady Akademii Nauk, 2008, vol. 418, no. 2, pp. 282–285. (In Russ.)*]
11. Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В. Аллергический ринит: учебное пособие. Кемерово: КемГМУ, 2022. 81 с. [Shabaldina E.V., Shabaldin A.V. Allergic rhinitis: a textbook. *Kemerovo: KemGMU, 2022. 81 p. (In Russ.)*]
12. Litvinova E.A., Goncharova E.P., Zaydman A.M., Zenkova M.A., Moshkin M.P. Female scent signals enhance the resistance of male mice to influenza. *PLoS One, 2010, vol. 5, no. 3: e9473. doi: 10.1371/journal.pone.0009473*
13. Kirk-Smith M., Booth D., Canol D., Davies P. Human sexual attitudes afected by androstenol. *Research Communicatios in Psychology, Psychiatry, and Behavior, 1978, vol. 3, no. 4: 379.*
14. Tamagawa A., Gerlinskaya L.A., Nagatomi R., Moshkin M.P. Female pheromone and physical exercise improve endocrine status in elderly japanese men. *Anti-Aging Medicine, 2008, vol. 5, no. 6, pp. 57–62. doi: 10.3793/jaam.5.57*
15. White T.L., Cunningham C. Sexual Preference and the Self-Reported Role of Olfaction in Mate Selection. *Chem. Percept., 2017, vol. 10, pp. 31–41. doi: 10.1007/s12078-017-9223-9*

**Авторы:**
**Бедарева А.В.**, к.б.н., доцент кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия;
**Шабалдина Е.В.**, д.м.н., доцент, зав. кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет, г. Кемерово, Россия;
**Астафьева Е.А.**, ассистент кафедры морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия; инженер-технолог лаборатории цитогенетики Института экологии человека ФИЦ угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия;
**Чуянова А.А.**, к.б.н., доцент кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия;
**Шабалдин А.В.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия.

**Authors:**
**Bedareva A.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation;
**Shabaldina E.V.**, DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Otorhinolaryngology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation;
**Astafyeva E.A.**, Assistant Professor, Department of Morphology and Forensic Medicine, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation; Engineer-Technologist, Laboratory of Cytogenetics, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation;
**Chuyanova A.A.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation;
**Shabaldin A.V.**, DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.03.2023
Принята к печати 02.05.2023

Received 18.03.2023
Accepted 02.05.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 735–742

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 735–742

# ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *UGE KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ЛОКАЛЬНОМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

**А.В. Устюжанин, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, А.А. Маханек**

*ФГБУ НИИ охраны материнства и детства Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия*

**Резюме.** *Цель исследования*: оценить результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена *uge* штаммов *K. pneumoniae* в перинатальном центре. *Материалы и методы.* Проанализировано 56 последовательностей гена *uge K. pneumoniae*. Ген *uge* детектировали методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе «ДТ лайт» (Россия). *Результаты.* Частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов отделений акушерско-гинекологического профиля составила в среднем 1,4% в 2020–2023 гг. В стационарах педиатрического профиля выделение штаммов в диапазоне 12–14% регистрируется в 2020, 2021 и 2023 гг. В 2022 г. зарегистрировано четырехкратное снижение выявления штаммов *K. pneumoniae*. Филогенетический анализ показал, что нуклеотидные последовательности достоверно сгруппировались в 14 кластеров. Ген фактора вирулентности *K. pneumoniae uge* регистрируется в 64,3%. Популяция выделенных от пациентов перинатального центра с 2019 по 2023 гг. штаммов *K. pneumoniae*, нуклеотидные последовательности которых проанализированы филогенетическим методом, является гетерогенной. Существуют кластеры, объединяющие геноварианты бактерий, выделенные в 2019 г., и не пополнившиеся новыми изолятами, что подтверждает эффективность проводимых противоэпидемических мероприятий, усиленных в период распространения новой коронавирусной инфекции, исключающих передачу инфекционного агента от источника восприимчивому организму во внутрибольничной среде. Определены аминокислотные замены в гене *uge* P249Q, N279L, отличающие гипервирулентные штаммы от тех, которые имеют меньшую степень патогенности. В четырех из пяти пар мать-ребенок нуклеотидные последовательности гена *uge* штаммов *K. pneumoniae* были генетически более близки друг другу и отличались от выделенных из биологического материала пациентов отделений, что свидетельствует о высокой степени их родства и с большой долей вероятности указывает на то, что источником штамма для ребенка явилась его мать, а не пациенты отделений или персонал учреждения. В одной паре мать–ребенок штаммы *K. pneumoniae* принадлежали разным кластерам. Изолят, выделенный 06.09.2021 г. из фекалий новорожденного ребенка (7 суток), группировался со штаммами, выделенными от пациентки родового отделения 12.12.2020 г. и в Лаосе в 2013 г. (CP035196). *K. pneumoniae*, выделенная 04.06.2021 г. из мочи женщины, достоверно группировалась со штаммами, вошедшими в 13 кластер. *Вывод.* Продемонстрирована возможность совершенствования локального микробиологического мониторинга методами секвенирования и филогенетического анализа гена *uge K. pneumoniae*. Оценка изменения внутривидовой популяционной структуры возбудителей ИСМП необходима для своевременного и обоснованного реагирования на ухудшение эпидемиологической ситуации.

***Ключевые слова:*** *секвенирование, филогенетический анализ, ген uge, Klebsiella pneumoniae, мониторинг, неонатология, эпидемиология.*

**Адрес для переписки:**
Устюжанин Александр Владимирович
620089, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1,
ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России.
Тел.: 8 908 924-94-19.
E-mail: ust103@yandex.ru

**Contacts:**
Alexander V. Ustyuzhanin
620089, Russian Federation, Ekaterinburg, Repina str., 1,
Ural Research Institute for the Protection of Maternity and Infancy.
Phone: +7 908 924-94-19.
E-mail: ust103@yandex.ru

**Для цитирования:**
Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Маханек А.А. Филогенетический анализ гена uge Klebsiella pneumoniae в локальном микробиологическом мониторинге // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 735–742. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-12421

**Citation:**
Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Makhanyok A.A. Phylogenetic analysis of the Klebsiella pneumoniae uge gene in local microbiological monitoring // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 735–742. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-12421



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PAO-12421

# PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE UGE* GENE IN LOCAL MICROBIOLOGICAL MONITORING

**Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Makhanyok A.A.**

*Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of the study was to evaluate the data of phylogenetically analyzed nucleotide sequences from the *K. pneumoniae* strain *uge* genes carried out in the perinatal center. *Materials and methods.* Fifty-six sequences of the *K. pneumoniae uge* gene were analyzed. The uge gene was detected by real-time PCR using DT light amplifier (Russia). *Results.* The rate of *K. pneumoniae* strains among patients of obstetric and gynecological departments in 2020–2023 averaged 1.4%. In pediatric hospitals, the isolation of *K. pneumoniae* strains comprised 12–14% in 2020, 2021 and 2023. In 2022, a fourfold decrease in detected *K. pneumoniae* strains was recorded. Phylogenetic analysis showed that the nucleotide sequences were significantly grouped into 14 clusters. The *K. pneumoniae* virulence factor *uge* gene is found in 64.3% cases. The nucleotide sequences allowed to detect heterogeneous *K. pneumoniae* strain population isolated from patients at the perinatal center from 2019 to 2023 analyzed by the phylogenetic method. There are clusters that combine *K. pneumoniae* genovariants isolated in 2019 and not replenished with new isolates, which confirms the effectiveness of ongoing anti-epidemic measures, enhanced during COVID-19 spread, excluding the transmission of an infectious agent from a source to a susceptible organism in nosocomial environment. P249Q, N279L amino acid substitutions within the uge gene were determined, which distinguish hypervirulent strains from those with a lower degree of pathogenicity. Out of five mother-child pairs, in four — nucleotide sequences of *K. pneumoniae* strain *uge* gene were genetically closer to each other than to other strains isolated from patients of the Medical Departments suggesting about a high degree of their relationship, highly likely indicating that the source of the strain for the child was the paired mother, and not the patients of the departments or the staff of the institution. In one mother-child pair, *K. pneumoniae* strains belonged to different clusters. The isolate obtained on 09/06/2021 from neonatal faeces (age: 7 days old) was grouped with strains isolated on 12/12/2020 from a patient in the maternity ward and in Laos in 2013 (CP035196). *K. pneumoniae* isolated on 06/04/2021 from the urine of a woman, was significantly grouped with strains included in cluster 13. *Conclusion.* An opportunity for improving local microbiological monitoring by sequencing and phylogenetic analysis of *K. pneumoniae uge* gene has been demonstrated. Assessment of changes in the intraspecies population pattern of HCAI pathogens is necessary for a timely and reasonable response to the deterioration of the epidemiological situation.

***Key words:*** *sequencing, phylogenetic analysis, uge gene, Klebsiella pneumoniae, monitoring, neonatology, epidemiology.*

## Введение

*Klebsiella pneumoniae* — это типичный представитель семейства *Enterobacteriaceae*, который может обладать широким спектром генетических детерминант антибиотикорезистентности и факторов вирулентности. Бессимптомные носители *K. pneumoniae* выделяют бактериальные клетки и являются источниками инфекционных агентов, способствуя их распространению во внутрибольничной среде. С этим микроорганизмом связывают как внутрибольничное инфицирование госпитализированных лиц в стационары хирургического, ожогового, неврологического, терапевтического профилей, так и эпидемические вспышки в неонатальных отделениях [2, 11]. Из двух эволюционно сложившихся линий *K. pneumoniae* наиболее частыми возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются штаммы классического патотипа в отличие от гипервирулентного — с которым ассоциированы внебольничные случаи инвазивных процессов (абсцесс печени, менингит), эндофтальмита [1]. В настоящее время в литературе описано 16 генов, кодирующих синтез факторов вирулентности, имеющих разный вклад в реализацию патогенного потенциала [3, 17]. Одним из них является ген *uge* хромосомной локализации, кодирующий синтез уридиндифосфатгалактуронат-4-эпимеразу, который принимает участие в колонизации, инвазии и реализации патогенности штаммов *K. pneumoniae* [12].

Ген *uge* является распространенным геном фактора вирулентности и частота его встречаемости, согласно результатам некоторых исследований превышает 90% [7, 18]. Однако нет единых сведений по частоте встречаемости штаммов с *uge*, выделенных из разных локусов человеческого организма. По данным одних авторов, он детектировался чаще ($p = 0,03$) в штаммах, выделенных из мочи, чем из образцов крови и аспирата трахеи, что может указывать на возможную роль этого гена в развитии инфекций мочевыводящих путей [5]. Другие авторы описывают, что в исследовании, проведенном в 2018–2019 гг. в Бангладеш, распространенность гена *uge* среди штаммов, *K. pneumoniae*, выделенных как из проб мочи, так и аспирата трахеи была одинаковой и составила 47% [16].

В статье Su S. и соавт. (2020 г.), указано, что ген *uge* был детектирован во всех исследуемых штаммах, выделенных от пациентов лечебного учреждения в Северо-Восточном Китае [14].

Другая группа исследователей обнаружила ген *uge* в 16% изученных антибиотикорезистентных штаммах в одном из госпиталей Малайзии [8]. Сиквенс-типы, выявленные в РФ впервые в период 2017–2019 гг. также несли ген *uge* в 85,7% [6].

Изоляты с гиперпродукцией слизи (гипервирулентный патотип) также содержат ген *uge* в 85,7% случаев [10]. Реализация генетической информации определяется воздействием как внутренних, так и внешних факторов. В штаммах, выделенных из проб морской воды Сиамского залива, NaCl в концентрации 4% блокировал экспрессию указанного гена, детектированного в 47,9% [9].

Подробная характеристика генетического аппарата изолятов позволяет оценивать внутривидовое разнообразие микроорганизмов и формирование эволюционных эпидемически и клинически значимых линий *K. pneumoniae*. Современные методы высокопроизводительного секвенирования способствуют проведению эпидемического наблюдения за циркуляцией штаммов как в глобальном масштабе, так и на локальном уровне, однако остаются недоступными для широкого применения. Открытым остается вопрос об идентичности штаммов со сходными фенотипическими свойствами, выделенных из разного клинического материала, например, фекалии, кровь, от одного и того же человека и от разных пациентов учреждения. Это диктует необходимость проведения внутривидовой дифференциации выделенных штаммов.

В настоящей работе продемонстрирована возможность использования молекулярно-генетических методов исследования (ПЦР, секвенирование с последующим филогенетическим анализом) в оценке гетерогенности популяции штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов лечебного учреждения, установлении степени генетического родства изолятов, полученных в парах мать–ребенок, и применения полученных результатов в эпидемиологическом надзоре за распространением потенциальных возбудителей ИСМП во внутрибольничной среде.

Цель исследования: оценить результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена *uge* штаммов *K. pneumoniae* в перинатальном центре.

## Материалы и методы

В период с 01.01.2020 по 09.03.2023 исследована 5351 проба фекалий, 10 249 проб отделяемого из цервикального канала, 104 пробы отделяемого из зева, 1928 образцов крови, 998 образцов мочи. В ходе локального еженедельного микробиологического мониторинга выделен 551 штамм *K. pneumoniae* от новорожденных детей (545 из фекалий и 6 из крови) и 168 — от женщин (144 штамма из отделяемого цервикального канала, 4 — из зева, 20 — из мочи). Проанализировано 56 нуклеотидных последовательностей гена *uge K. pneumoniae*, в том числе депонированной в GenBank под номером MZ395252 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Клинический материал для исследования собирали и транспортировали в стерильных контейнерах и пробирках с транспортной средой. Для культивирования бактерий посев материала выполняли на среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск, Россия), кровяно-сывороточный агар (основа — Conda, Испания; эритроциты барана, ЗАО «ЭКОлаб», Россия; сыворотка крови крупного рогатого скота, ООО «БиолоТ», Россия). Идентификацию *K. pneumoniae* и определение антибиотикочувствительности проводили на автоматическом анализаторе «VITEK 2 compact» (bioMérieux, Франция, входит в перечень оборудования ЦКП «Инновационный научно-лабораторный центр перинатальной и репродуктивной медицины» ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России) согласно инструкции производителя.

ДНК бактериальных клеток выделяли из взвеси 18-часовой культуры с использованием набора ДНК-экспресс (ООО «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Ген *uge* детектировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров (5'-TCTTCACGCCTTCCTTCACT-3', 5'-GATCATCCGGTCTCCCTGTA-3') и реагентов производства ООО «Синтол». Визуализацию ПЦР продуктов осуществляли в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе «ДТ лайт» (ДНК-Технологии, Россия). В состав раствора для амплификации входили 50 мкл реакционной смеси: 2,5х ПЦР буфер Б (KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 мМ $MgCl_2$), Syn-Taq ДНК-полимераза, глицерол, Tween 20; дезоксинуклеозидтрифосфаты, 7 мкл dd $H_2O$, 25 мМ $MgCl_2$, по 1 мкл каждого праймера и 2,5 мкл образца ДНК. Режим амплификации: первоначальная денатурация в течение 5 мин при температуре 95°C, последующие 35 циклов: 94°C — 15 с; отжига праймеров при температуре 55°C для *uge* в течение 20 с; элонгации при температуре 72°C в течение 30 с; завершающим этапом каждого цикла была детекция продуктов амплификации.

Секвенирование гена *uge* проводили по методу Сенгера [13]. Полученные последовательности типировали с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Выравнивание нуклеотидных последовательностей на часть референсного генома KPHS_35510, кодирующего уридиндифосфат-галактуронат-4-эпимеразу [*Klebsiella pneumoniae*

subsp. *pneumoniae* HS11286, (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11848582)]. Последующий филогенетический анализ проводили с использованием программы Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), версия 6 [15].

Филограмма была построена по алгоритму «ближайшего соседа» (Neighbor-Joining) и включала нуклеотидные последовательности, депонированные в GenBank.

Расчет эволюционных дистанций между последовательностями производили согласно двухпараметрической модели М. Кимуры (Kimura 2-parameter). Статистическую значимость топологии филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик. Достоверными считали построения дендрограммы при индексе в узлах не менее 70.

## Результаты

Частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* в клиническом материале от пациентов представлена в табл. 1.

Как видно из представленных в таблице данных, частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов отделений родовспоможения акушерско-гинекологического профиля составила в среднем 1,4% в 2020–2023 гг. среди женщин. В стационарах педиатрического профиля выделение штаммов в диапазоне 12–14% регистрируется в 2020, 2021 и 2023 гг. В 2022 г. зарегистрировано четырехкратное снижение выявляемых штаммов *K. pneumoniae*.

Филогенетический анализ показал, что нуклеотидные последовательности достоверно сгруппировались в 14 кластеров (рис.).

Штаммы, входящие в один кластер являются генетически более близкими между собой, в сравнении с изолятами, расположенными в разных кластерах.

Первый кластер объединяет штаммы с повышенной вирулентностью серотипа K-1, описанные в исследовании Лев А.И. (2018 г.). В него вошел продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС) изолят из Екатеринбурга, имеющий ген *rmpA*, ассоциированный с гиперпродукцией слизи, выделенный в 2021 г. из пробы фекалий, полученной от 19-летней беременной женщины на 31–32 неделе гестации, госпитализированной в родовое отделение.

Во второй кластер вошли карбапенемаза продуцирующие ($bla_{kpc+}$) штаммы, выделенные из отделяемого цервикального канала 31-летней женщины на 31 неделе беременности. Следует отметить, что нуклеотидные последовательности не являются идентичными, что согласуется с разной фенотипической характеристикой: колонии одного изолята были малинового цвета, а другого — розового.

Несмотря на то что БЛРС-продуцирующие штаммы 662, 665, выделенные из отделяемого цервикального канала 38-летней пациентки на сроке беременности 31 неделя, при посеве последа и из кала ее ребенка в возрасте 4 суток, не сформировали отдельный кластер, идентичность их нуклеотидных последовательностей анализируемого бактериального гена составила 100%.

Третий кластер включает идентичные штаммы, выделенные из мочи беременной женщины (даты сбора: 28.01.2021 и 26.03.2021) и фекалий ее новорожденного ребенка, собранных на 5 сутки после рождения. При этом следует отметить, что при посеве отделяемого цервикального канала (27.04.2021, 25.03.2021, 07.05.2021), посеве крови и содержимого трахеобронхиального дерева новорожденного ребенка на 1 сутки жизни рост микроорганизмов не обнаружен.

Штаммы, сгруппировавшиеся в четвертом, шестом, девятом, десятом, одиннадцатом и тринадцатом кластерах, описаны нами ранее под VI, I, II, V, IV, VII номерами соответственно [4]. Девятый (II) и одиннадцатый (IV) кластеры, так же как и охарактеризованные ранее, содержат штаммы, выделенные в 2019 г., они по-

**Таблица 1. Частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* в образцах фекалий новорожденных детей и пробах отделяемого цервикального канала в 2020–2023 гг.**

Table 1. The 2020–2023 prevalence of *K. pneumoniae* strains in neonatal fecal and cervical canal discharge samples

| Материал Material | 2020 | | | 2021 | | | 2022 | | | 2023 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Кол-во проб Number of samples | *K. pneum.* абс. abs. | *K. pneum.* % | Кол-во проб Number of samples | *K. pneum.* абс. abs. | *K. pneum.* % | Кол-во проб Number of samples | *K. pneum.* абс. abs. | *K. pneum.* % | Кол-во проб Number of samples | *K. pneum.* абс. abs. | *K. pneum.* % |
| **Фекалии** Feces | 1796 | 220 | 12,2 | 1669 | 213 | 12,8 | 1477 | 55 | 3,7 | 409 | 57 | 13,9 |
| **Отделяемое цервикального канала** Cervical discharge | 3239 | 58 | 1,8 | 3578 | 42 | 1,7 | 2775 | 36 | 1,3 | 657 | 8 | 1,2 |

полнились штаммами, выделенными из фекалий новорожденного ребенка и из отделяемого цервикального канала в 2021, 2022 гг. Штаммы, генетически близкие изолятам из четвертого (VI), шестого (I), десятого (V) и тринадцатого (VII) кластеров не удалось выделить на протяжении 2020–2023 гг.

Штамм, выделенный из фекалий новорожденного ребенка в возрасте 6 суток, родившегося на 35 неделе, вместе с генетически близким штаммом KX954850, обнаруженным в мокроте пациента с пневмонией (Оболенск), сформировали пятый кластер.

*K. pneumoniae* 601, колонизировавшая кишечник новорожденного ребенка в возрасте 12 суток, рожденного на 34 неделе гестации, оказалась со штаммами KX954849, KP760055, выделенными из пробы мочи (Оболенск, 2013 и 2014 гг.), в седьмом кластере.

Восьмой кластер демонстрирует генетическое родство штаммов, выделенных из разных локусов (кровь, фекалии) одного пациента, что позволяет с высокой долей вероятности предполагать о проникновении возбудителя в кровеносное русло путем трансцитоза через кишечную стенку. Это еще раз подтверждает необходимость проведения локального микробиологического мониторинга в отделениях недоношенных новорожденных детей для установления видов микроорганизмов, колонизирующих кишечный биотоп, как наиболее вероятных возбудителей позднего сепсиса для выбора адекватной тактики антибиотикотерапии.

Группа бактерий № 639, 629, 628, 643 не сформировала отдельный кластер, но содержит идентичные последовательности изолятов, выделенных из отделяемого цервикального канала, последа, крови обоих детей из двойни. Следует отметить, что штаммы из гемокультуры выделены на первые сутки жизни детей, что подтверждает внутриутробное инфицирование и определяет этиологический агент раннего неонатального сепсиса, закончившегося летально для обоих новорожденных.

Двенадцатый кластер представлен штаммом из отделяемого цервикального канала женщины 23 лет с длительным безводным промежутком в первом периоде срочных родов (2020 г.). Наиболее генетически близкий вариант CP035196 был выделен в Лаосе в 2012 г.

Четырнадцатый кластер объединил штаммы 2020 г. от матери и ее новорожденного ребенка, которые были наиболее генетически близки изоляту CP065831, выделенному из мочи в США в 2018 г.

Сравнительный анализ аминокислотных замен гена *uge* в штаммах *K. pneumoniae*, изолированных в период 2019–2023 г. с референсной последовательностью KPHS_35510, кодирующего уридиндифосфат-галактуронат-4-эпимеразу

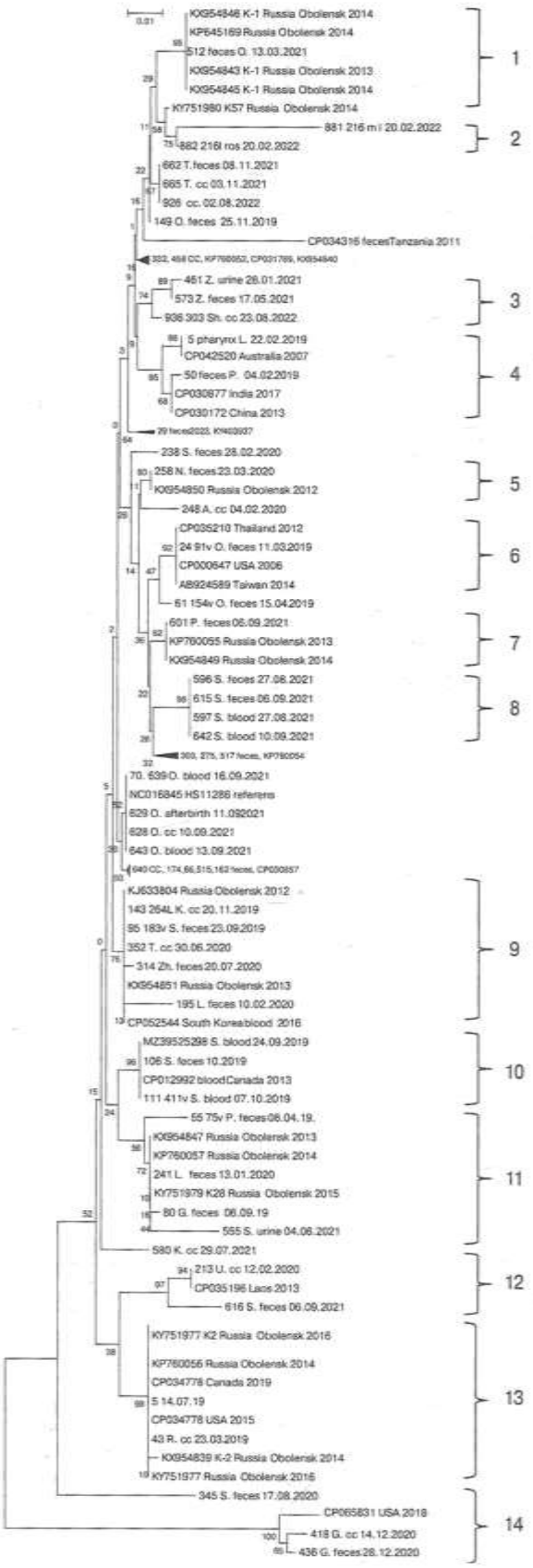


**Рисунок. Филогенетическое дерево штаммов *K. pneumoniae*, построенное при анализе нуклеотидных последовательностей гена *uge* (362 нт)**

Figure. Phylogenetic tree for *K. pneumoniae* strain *uge* gene nucleotide sequences (362 nt)

**Таблица 2. Сравнительный анализ аминокислотных замен гена *uge* в штаммах *K. pneumoniae*, изолированных в период 2019–2023 гг.**

Table 2. 2019–2023 Comparative analysis of amino acid substitutions in the *K. pneumoniae uge* gene strains

| Ам. Am. | P157L | I163T | P166L | I167T | A170V | P173L | Q180R | F181C | G185R | C192Y | S194N | E202G | V204A | S214N | S217L | F228C | G229A | R231W | P237R | A245T | P247L | R248Q | P249Q | A251V | I255T | Y257S | H264S | Q265R | P273L | P274L | R277K | R278K | N279L | E280G | S290F | E293A |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Реф. Ref. | P | I | P | I | A | P | Q | F | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | Y | H | Q | P | P | R | R | N | E | S | E |
| 1 | P | I | P | T | A | P | R | F | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | Q | A | I | Y | H | Q | P | L | R | R | L | E | F | A |
| 2 | P | I | P | T | A | P | Q | C | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | Y | H | Q | P | L | R | R | N | E | F | A |
| 3 | L | T | L | T | A | P | Q | F | R | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | Y | H | Q | P | P | R | R | N | E | S | E |
| 4 | P | I | P | I | A | P | R | F | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | V | I | Y | H | Q | P | P | R | K | N | E | S | E |
| 5 | L | T | L | T | A | P | Q | C | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | T | Y | H | R | P | P | R | R | N | E | S | E |
| 6 | L | T | P | T | A | L | Q | C | G | C | S | E | A | S | S | F | G | W | P | A | P | R | P | A | T | Y | H | Q | L | P | R | R | N | G | S | E |
| 7 | L | T | L | T | A | P | Q | F | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | L | A | T | Y | H | Q | L | P | R | R | N | G | S | E |
| 8* | P | I | P | I | A | P | R | F | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | T | Y | H | Q | L | P | R | R | N | K | F | A |
| 9 | L | T | P | T | A | P | Q | C | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | Y | H | R | P | P | R | R | N | E | S | E |
| 10* | L | T | L | T | A | P | Q | F | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | Y | H | Q | L | P | R | R | N | G | S | A |
| 11 | L | T | P | T | A | P | Q | C | G | C | S | E | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | S | R | Q | P | L | R | R | N | G | S | A |
| 12 | L | I | L | T | A | P | Q | F | G | C | S | E | V | N | L | C | A | R | R | T | L | R | P | A | I | Y | H | Q | P | P | R | R | N | G | S | E |
| 13 | L | T | P | T | V | P | Q | F | G | C | S | E | A | S | S | F | G | R | P | T | L | R | P | A | I | Y | H | Q | P | P | R | K | N | E | F | A |
| 14 | L | T | L | T | A | P | Q | C | G | Y | N | G | V | S | S | F | G | R | P | A | P | R | P | A | I | Y | H | Q | P | P | R | R | N | E | S | E |

**Примечание.** * — штамм, входящий в кластер, вызвал генерализованную инфекцию; Ам — аминокислотные замены; Реф. — референсная аминокислотная последовательность.

Note. * — a strain in the cluster caused a generalized infection; Am — amino acid substitutions; Ref. — reference amino acid sequence.

[*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286], представлен в табл. 2. Жирным шрифтом выделены аминокислотные замены, отличающие гипервирулентные штаммы от других.

## Обсуждение

В среднем частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов учреждения родовспоможения, установленная в ходе микробиологического мониторинга составила 1,4% в 2020–2023 г. среди женщин, 12,5% в 2020–2021 гг., 3,7% в 2022 г. и 13,9% в 2023 г. среди детей. Отмечается одинаковая распространенность штаммов из отделяемого цервикального канала и четырехкратное снижение выявление штаммов из фекалий детей в 2022 г. по сравнению с 2020, 2021 гг. с последующим увеличением частоты обнаружения до 13,9% в первом квартале 2023 г.

Согласно проведенным нами исследованиям, ген фактора вирулентности *K. pneumoniae uge*, в изучаемых штаммах регистрируется на уровне 64,3%. В наших предыдущих публикациях мы описывали результаты филогенетического анализа гена *uge* штаммов *K. pneumoniae*, выделенных до 2021 г. [4]. В данном исследовании представляем результаты мониторинга штаммов и изучение их гетерогенности за пятилетний период (2019–2023 гг.).

Существуют кластеры, объединяющие геноварианты бактерий, выделенные в 2019 г. и не пополнившиеся новыми изолятами, что подтверждает эффективность проводимых противоэпидемических мероприятий, усиленных в период распространения новой коронавирусной инфекции, исключающих передачу инфекционного агента от источника восприимчивому организму во внутрибольничной среде.

Определены аминокислотные замены в гене *uge* P249Q, N279L, отличающие гипервирулентные штаммы от тех, которые имеют меньшую степень патогенности, что может быть использовано в индикации клинически значимых изолятов.

Колонизация кишечника новорожденного ребенка, штаммом, идентичным выделенному из мочи его матери и не обнаруженному при исследовании отделяемого цервикального канала, свидетельствует о проникновении в организм ребенка бактерий из мочевыделительной системы матери.

В одной паре мать–ребенок штаммы *K. pneumoniae* принадлежали разным кластерам. Изолят, выделенный 06.09.2021 г. из фекалий новорожденного ребенка (7 суток), группировался со штаммами, выделенными от пациентки родового отделения 12.12.2020 г. и в Лаосе в 2013 г. (CP035196). *K. pneumoniae*, выявленная 04.06.2021 г. в моче женщины, достоверно группировалась со штаммами, вошедшими в 13 кластер. Следует отметить, что в период с 04.06.2021 г. по 06.09.2021 г. в ходе бактериологического исследования *K. pneumoniae* не обнаружена ни в моче, ни в отделяемом цервикального канала описанной пациентки.

Таким образом, продемонстрирована возможность совершенствования локального микробиологического мониторинга с применением молекулярно-генетических методов исследования и использования результатов секвенирования и филогенетического анализа гена *uge K. pneumoniae* в эпидемиологическом надзоре за внутрибольничным распространением штаммов. Оценка изменения внутривидовой популяционной структуры возбудителей ИСМП необходима для своевременного и обоснованного реагирования на ухудшение эпидемиологической ситуации.

## Список литературы/References


1. Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у Klebsiella pneumoniae // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460. [Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in Klebsiella pneumoniae. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 450–460. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825*
2. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов Klebsiella pneumoniae, выделенных в многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 79–84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in Klebsiella pneumoniae strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 79–84. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84*
3. Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н., Данилова Е.М., Беспалова Г.И. Значение факторов патогенности некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении их этиологической роли в развитии воспалительных процессов респираторного тракта // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 121–128. [Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M., Bespalova G.I. The importance of pathogenicity factors of some Streptococcus spp. and Klebsiella spp. in determining their etiological role in the inflammatory processes of the respiratory tract. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 121–128. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1339*
4. Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Филогенетический анализ родства штаммов Klebsiella pneumoniae по генам uge и fim // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 6. С. 556–563. [Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The relatedness of Klebsiella pneumoniae strains based on phylogenetic analysis of uge and fim genes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2020, vol. 97, no. 6, pp. 556–563. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-6*

5. Ballén V., Gabasa Y., Ratia C., Ortega R., Tejero M., Soto S. antibiotic resistance and virulence profiles of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical sources. *Front. Cell Infect. Microbiol., 2021, vol. 11: 738223. doi: 10.3389/fcimb.2021.738223*
6. Fursova N.K., Astashkin E.I., Gabrielyan N.I., Novikova T.S., Fedyukina G.N., Kubanova M.K., Esenova N.M., Sharapchenko S.O., Volozhantsev N.V. Emergence of five genetic lines ST39[NDM-1, ST13OXA-48, ST3346OXA-48, ST39CTX-M-14, and novel ST3551OXA-48 of multidrug-resistant clinical Klebsiella pneumoniae in Russia. *Microb. Drug Resist., 2020, vol. 26, no. 8, pp. 924–933. doi: 10.1089/mdr.2019.0289*
7. Hasani A., Soltani E., Ahangarzadeh Rezaee M., Pirzadeh T., Ahangar Oskouee M., Hasani A., Gholizadeh P., Noie Oskouie A., Binesh E. Serotyping of Klebsiella pneumoniae and its relation with capsule-associated virulence genes, antimicrobial resistance pattern, and clinical infections: a descriptive study in medical practice. *Infect. Drug Resist., 2020, vol. 13, pp. 1971–1980. doi: 10.2147/IDR.S243984*
8. Mobasseri G., Thong K.L., Rajasekaram G., Teh C.S.J. Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae from a Malaysian hospital. *Braz. J. Microbiol., 2020, vol. 51, no. 1, pp. 189–195. doi: 10.1007/s42770-019-00208-w*
9. Nimnoi P., Pongsilp N. Identification, characterization, and virulence gene expression of marine enterobacteria in the upper gulf of Thailand. *Microorganisms., 2022, vol. 10, no. 3: 511. doi: 10.3390/microorganisms10030511*
10. Osama D.M., Zaki B.M., Khalaf W.S., Mohamed M.Y.A., Tawfick M.M., Amin H.M. Occurrence and molecular study of hypermucoviscous/hypervirulence trait in gut commensal K. pneumoniae from healthy subjects. *Microorganisms, 2023, vol. 11, no. 3: 704. doi: 10.3390/microorganisms11030704*
11. Pruss A., Kwiatkowski P., Masiuk H., Bilska I., Giedrys-Kalemba S., Dołęgowska B. Epidemiological analysis of extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae outbreak in a neonatal clinic in Poland. *Antibiotics (Basel), 2022, vol. 12, no. 1: 50. doi: 10.3390/antibiotics12010050*
12. Remya P.A., Shanthi M., Sekar U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in Klebsiella pneumoniae. *Indian J. Med. Microbiol., 2019, vol. 37, no. 2, pp. 210–218. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_19_157*
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463*
14. Su S., Zhang J., Zhao Y., Yu L., Wang Y., Wang Y., Bao M., Fu Y., Li C., Zhang X. Outbreak of KPC-2 carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae ST76 and carbapenem-resistant K2 Hypervirulent Klebsiella pneumoniae ST375 strains in Northeast China: molecular and virulent characteristics. *BMC Infect. Dis., 2020, vol. 20, no. 1: 472. doi: 10.1186/s12879-020-05143-y*
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol., 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729 doi: 10.1093/molbev/mst197.*
16. Tanni A.A., Hasan M.M., Sultana N., Ahmed W., Mannan A. Prevalence and molecular characterization of antibiotic resistance and associated genes in Klebsiella pneumoniae isolates: a clinical observational study in different hospitals in Chattogram, Bangladesh. *PLoS One, 2021, vol. 16, no. 9: e0257419. doi: 10.1371/journal.pone.0257419*
17. Vargas J.M., Moreno Mochi M.P., Nuñez J.M., Cáceres M., Mochi S., Del Campo Moreno R., Jure M.A. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing K. pneumoniae. *Heliyon, 2019, vol. 5, no. 6: e01829. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01829*
18. Xu T., Wu X., Cao H., Pei T., Zhou Y., Yang Y., Yang Z. The characteristics of multilocus sequence typing, virulence genes and drug resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from cattle in Northern Jiangsu, China. *Animals (Basel), 2022, vol. 12, no. 19: 2627. doi: 10.3390/ani12192627*

**Авторы:**

**Устюжанин А.В.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия;

**Чистякова Г.Н.**, д.м.н., профессор, руководитель отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия;

**Ремизова И.И.**, к.б.н., старший научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия;

**Маханек А.А.**, младший научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия.

**Authors:**

**Ustyuzhanin A.V.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Chistyakova G.N.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Remizova I.I.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Makhanyok A.A.**, Junior Researcher, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.06.2023
Принята к печати 28.08.2023

Received 05.06.2023
Accepted 28.08.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 743–753

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 743–753

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РИНОВИРУСОВ НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА В 2020–2021 гг.

**А.Д. Ксенафонтов[1], М.М. Писарева[1], В.А. Едер[1], Т.Д. Мусаева[1], А.В. Фадеев[1], А.Б. Комиссаров[1], И.В. Киселева[1,2], Д.А. Лиознов[1,3]**

[1] *ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** *Введение.* Риновирусы — одни из самых распространенных респираторных вирусов. Риновирусы относятся к семейству *Picornoviridae*, роду *Enterovirus.* Они делятся на три вида: A, B, C, на которые приходится 169 типов. Риновирусы преобладают в осенние и весенние периоды, хотя они циркулируют на протяжении практически всего эпидемического сезона. Геном риновирусов представлен одноцепочечной +РНК длиной 7,2 тыс. оснований. Согласно данным литературы, наиблее распространенным видом риновирусов является риновирус A (HRV-A), затем следуют риновирусы C (HRV-C), в меньшей степени распространены риновирусы B (HRV-B). Целью данной работы было исследование генетического разнообразия риновирусов на территории Санкт-Петербурга. *Материалы и методы.* Исследование проводилось на базе лаборатории молекулярной вирусологии вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева. Образцы (мазки из носо- и ротоглотки) доставляли из Клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина, Детской городской больницы Св. Ольги и Детской городской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова. Также в работу брались мазки от негоспитализированных пациентов. Исследовались образцы, поступившие с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. Детекция риновирусов проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. Генотипирование осуществлялось путем секвенирования методом Сэнгера, с праймерами, разработанными da Costa Souza L. с соавт. (2021). *Результаты.* Согласно данным тотального тестирования, процент положительных на риновирус образцов составляет составляют 3,2% от общего числа. Из них был типирован 71, что составляет 17,03% от положительных на риновирус образцов. Наиболее распространенным оказался HRV-A (55%). Был обнаружен 21 тип данного вида (самый распространенный — HRV-A46 — 13%, n = 5). HRV-B и HRV-C были обнаружены в равном количестве — по 23% (n = 16) каждого вида от общего числа типированных риновирусов. Среди HRV-B обнаружено 8 типов (самый распространенный HRV-B06 — 31%, n = 5), среди HRV-C — 7 типов (самые распространенные типы HRV-C42, HRV-C32 и HRV-C15 — по 19%, n = 3). HRV-A выявлялся в основном у пациентов в возрасте от 18 до 65 лет (57,5%, n = 23). HRV-B выявлен только у взрослых пациентов (100%, n = 16). HRV-C детектирован у детей младше 2-х лет (43,75%, n = 7) и у взрослых в возрасте 18–65 лет (31,25%, n = 5). Иногда HRV-A и HRV-C были ассоциированы с различными синдромами поражения дыхательный путей, такими как острый ринофарингит, ларинготрахеит,

**Адрес для переписки:**
Ксенафонтов Андрей Дмитриевич
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России.
Тел.: 8 981 763-76-91.
E-mail: ksenandrey@yandex.ru

**Contacts:**
Andrei D. Ksenafontov
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 15/17,
Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone: +7 981 763-76-91.
E-mail: ksenandrey@yandex.ru

**Для цитирования:**
Ксенафонтов А.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Мусаева Т.Д., Фадеев А.В., Комиссаров А.Б., Киселева И.В., Лиознов Д.А. Генетическое разнообразие риновирусов на территории Санкт-Петербурга в 2020–2021 гг. // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 743–753. doi: 10.15789/2220-7619-AAR-11258

**Citation:**
Ksenafontov A.D., Pisareva M.M., Eder V.A., Musaeva T.D., Fadeev A.V., Komissarov A.B., Kiseleva I.V., Lioznov D.A. 2020–2021 rhinovirus genetic diversity in St. Petersburg // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 743–753. doi: 10.15789/2220-7619-AAR-11258



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAR-11258

обструктивный бронхит, пневмония. HRV-B был ассоциирован с клиническими проявлениями пневмонии в семи случаях. *Выводы.* На территории Санкт-Петербурга превалирует риновирус вида А. Риновирусы могут быть ассоциированы с различными синдромами поражения дыхательный путей.

***Ключевые слова:*** *риновирусы, генетическое разнообразие, виды, типы, ОРВИ, секвенирование.*

## 2020–2021 RHINOVIRUS GENETIC DIVERSITY IN ST. PETERSBURG

**Ksenafontov A.D.[a], Pisareva M.M.[a], Eder V.A.[a], Musaeva T.D.[a], Fadeev A.V.[a], Komissarov A.B.[a], Kiseleva I.V.[a,b], Lioznov D.A.[a,c]**

[a] *Smorodintsev Research Institute of Influenza, St.Petersburg, Russian Federation*
[b] *Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation*
[c] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (Pavlov University), St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** *Introduction.* Rhinoviruses represent one of the most common respiratory viruses and belong to the Picornoviridae family, genus Enterovirus, being divided into three types: A, B, C, which account for 169 types. Rhinoviruses predominate in autumn and spring periods, although they circulate throughout almost entire epidemic season. The rhinovirus genome is represented by a single-stranded 7.2 thousand base-long +RNA. According to the publications, the most common rhinovirus species is rhinovirus A (HRV-A), followed by rhinoviruses C (HRV-C) and finally rhinovirus B (HRV-B). The aim of our study was to define rhinovirus genetic diversity in St. Petersburg. *Materials and methods.* The study was conducted at the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza. Samples (smears from the nasopharynx and oropharynx) were delivered from the S.P. Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, St. Olga's Children's City Hospital, N.F. Filatov Children's City Clinical Hospital No. 5. Outpatient samples were used as well. Samples received from December 2020 to October 2021 were analyzed. Detection of rhinoviruses was carried out by real-time PCR, typing — by Sanger sequencing, with primers developed by da Costa Souza L. et al. (2021). *Results.* According to total specimen testing, rhinoviruses comprise 3.2% total number of specimens tested. Of these, 71 rhinoviruses were typed, representing 17.03% total number of rhinovirus-positive specimens. The most common was HRV-A (55%), among which 21 types were found (the most common HRV-A46 is 13%, n = 5). HRV-B and HRV-C were found in equal numbers — 23% (n = 16) of each species out of total number of typed rhinoviruses. Among HRV-B, 8 types were found; the most common HRV-B06 comprised 33% (n = 5). Among HRV-C, 7 types were found (the most common types are HRV-C42, HRV-C32 and HRV-C15 — 19% each, n = 3). HRV-A was detected mainly in patients aged 18 to 65 years (57.5%, n = 23). HRV-B was detected only in adult patients (100%, n = 16). HRV-C was detected in children under 2 years of age (43.75%, n = 7) and adults aged 18–65 years (31.25%, n = 5). In some cases, HRV-A and HRV-C were associated with various respiratory tract syndromes such as acute nasopharyngitis, laryngotracheitis, obstructive bronchitis, and pneumonia. HRV-B was related to clinical manifestations of pneumonia in seven cases. *Conclusion.* Rhinovirus type A prevails in St. Petersburg. Rhinoviruses can be associated with diverse respiratory tract syndromes.

***Key words:*** *rhinoviruses, genetic diversity, species, types, acute respiratory viral diseases, sequencing.*

## Введение

Риновирусы являются одними из наиболее распространенных возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) негриппозной этиологии [5, 10, 11, 23, 25, 26, 27, 28, 32, 33, 41].

Риновирусы циркулируют на протяжении всего эпидемического сезона ОРВИ (с октября каждого года) с характерным преобладанием в осенний и весенний периоды.

Основными клиническими признаками риновирусной инфекции являются клинические проявления синдромов ринита, риносинусита или ринофарингита (ринорея, заложенность носа, боли в горле, головные боли, недомогание и др.) [6]. Нередко заболевание осложняется острым средним отитом [7]. Также возможно поражение нижних дыхательных путей, например, бронхиолит и пневмония [18, 19, 31].

Риновирусы представляют собой безоболочечные, сферические РНК-содержащие вирусы. Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов, риновирусы относятся к реалму *Riboviria*, семейству *Picornoviridae*, подсемейству *Ensavirinae*, роду *Enterovirus*. Риновирусы делятся на три вида: А, В, С, на которые приходится 169 типов [8, 36], из которых известно 80 типов HRV-A, 32 типа HRV-B и 57 типов HRV-C [8]. Однако есть данные и о 179 типах [1]. В зависимости от рецепторной специфичности риновирусы (HRV) видов А и В подразделяются на основные, рецепторно-специфичные к молекуле клеточной адгезии ICAM-1, и минорные, прикрепляющиеся к рецептору липопротеинов низкой плотности LDLR [13, 15]. Риновирус С (HRV-C) прикрепляется к рецептору CDHR3 [20].

Геном риновирусов представлен одноцепочечной (+)РНК. Его длина составляет примерно

7,2 тыс. оснований [4]. К 5'-концу прикреплен праймерновый протеин 5'-VPg. Далее идет нетранслируемая последовательность 5'-UTR. Это наиболее консервативная область генома риновирусов, по ней происходит детекция риновирусов молекулярно-генетическими методами [17].

Классификация риновирусов основана на сходстве в организации генома, свойствах капсида и консервативности первичной последовательности. Риновирусы относятся к HRV-A или HRV-B, если они имеют более чем 70% идентичность аминокислотных последовательностей в областях P1, 2C и 3CD. Видовая классификация основана на последовательностях белка VP1 или VP4/VP2 [35].

Главными причинами высокого разнообразия риновирусов являются накопление нуклеотидных замен вследствие высокой вероятности возникновения ошибок во время работы фермента РНК-зависимой РНК-полимеразы, а также рекомбинация. Наибольшая частота мутаций обнаруживается в участках капсидных белков, образующих поверхностные эпитопы (в основном в регионе VP1). Рекомбинация чаще всего происходит в 5'-UTR (в первую очередь рядом с IRES), реже — в участке, кодирующем неструктурные белки. HRV-A и HRV-C часто рекомбинируют между собой в 5'-UTR и в участке гена протеазы 2A [35].

Мониторинг вирусов-возбудителей ОРВИ в разных странах демонстрирует приблизительно одинаковую картину преобладания в циркуляции риновирусов.

Так, Panning M. с соавт. [34] ретроспективно протестировали образцы, собранные в период со 2 декабря 2019 г. по 28 апреля 2020 г. в институте вирусологии во Фрайбурге (Германия) от пациентов старше 18 лет с признаками респираторного заболевания, и протестировали на респираторные вирусы. Пациенты были набраны из местных исследовательских центров Австрии, Германии, Нидерландов и Швейцарии. Риновирус был обнаружен в 7,2% образцов, и являлся наиболее распространенным респираторным вирусом в исследуемой группе.

Kim D. с соавт. [23] протестировали 1217 образцов из северной Калифорнии на SARS-CoV-2 и другие респираторные вирусы, включая риновирус. Риновирус оказался самым распространенным вирусом как среди образцов, отрицательных на SARS-CoV-2 (12,1% от отрицательных образцов на SARS-CoV-2), так и среди положительных на SARS-CoV-2 (6,9% от образцов, положительных на SARS-CoV-2).

Sominina A. с соавт. [37] протестировали образцы от 3057 пациентов разных возрастных групп из девяти больниц-участников в трех городах России (Санкт-Петербург, Новосибирск и Екатеринбург). Исследование проводилось с 52-й недели 2018 г. по 20-ю неделю 2019 г. По полученным данным, риновирус являлся вторым по распространенности вирусом негриппозной этиологии (8,2% от общего числа положительных образцов).

В другом исследовании Sominina A. с соавт. [38] представили результаты, полученные в рамках традиционного надзора за гриппом. ПЦР-диагностика проводилась в ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева и в Центре экологии и эпидемиологии гриппа при ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, признанными ВОЗ в качестве национальных центров по гриппу, а также в 57 региональных лабораториях. Период исследования охватывал несколько эпидемических сезонов (с 2015–2016 гг. по 2020–2021 гг.). Согласно представленным данным, риновирус являлся самым распространенным респираторным вирусом негриппозной этиологии во всех исследуемых сезонах, за исключением пандемического вируса SARS-CoV-2 в двух последних сезонах. Процентное соотношение от всех положительных вирусов негриппозной этиологии составляло от 5,4 до 6,8%.

В литературе также имеются данные о распространенности видов риновируса и их соотношении друг с другом. Так, Iwane M.K. с соавт. [16] ретроспективно протестировали на присутствие риновируса 1867 образцов от детей младше 5 лет с острыми респираторными заболеваниями с декабря 2003 г. по апрель 2005 г. в 3 округах США. Контрольную группу составили 784 ребенка, посещавшие клинки в этих округах в период с декабря 2003 г. по март 2004 г. и с октября 2004 г. по апрель 2005 г. HRV-A обнаружен у 8,1% госпитализированных детей старше 1 года и у 2,2% в контрольной группе, HRV-C — в 2,3 и 9,0% случаев соответственно (у детей до 8 месяцев). Среди детей младше 1 года и младше 8 месяцев процентное соотношение HRV-A и HRV-C было схожим в обеих группах (в основной и в контрольной). HRV-B было обнаружено менее 1%.

Lu Q.B. с соавт. [24] протестировали назофаренгеальные образцы, собранные в период 2009–2012 гг. в Китае. Среди 223 образцов, положительных на риновирус, HRV-A составлял 54,7%, HRV-B — 5,4% и HRV-C — 39,9%.

Zlateva K.T. с соавт. [42] провели ретроспективный анализ циркуляции риновирусов в 11 европейских странах (3016 образцов) за период с 2007 по 2010 г. Установлено, что HRV-A был наиболее распространенным видом риновируса в Бельгии, Франции, Германии, Италии, Нидерландах, Польше, Словакии, Словении, Испании, Швеции и Великобритании.

Представленные данные свидетельствуют, что самым распространенным риновирусом в разных регионах мира является HRV-A.

Риновирусная инфекция может приводить к серьезным последствиям для здоровья человека, например таким, как астма или хроническая обструктивная болезнь легких [29].

В ретроспективном исследовании Miller E.K. с соавт. [30] было показано, что среди 167 детей, положительных на риновирус, были выявлены дети, находящиеся в группе высокого риска возникновения тяжелых осложнений, таких как астма. В 42% образцах от таких детей был обнаружен HRV-C, а в 23% — HRV-A.

Схожие результаты показывают и Fawkner-Corbett D.W. с соавт. [14]. По данным их исследования, проводившегося в Бразилии с апреля 2008 по март 2010 г., риновирус был обнаружен в 18,7% случаев в образцах от 630 детей возрастом до 5 лет. Обычно риновирус детектировался у детей с бронхиолитом, пневмонией, астмой, а также синдромом свистящего дыхания. При этом у детей с астмой и синдромом свистящего дыхания в 23% случаев был обнаружен HRV-C, а HRV-A — в 5%.

В то же время, данные о видовом разнообразии риновирусов в Российской Федерации очень ограничены, в связи с чем изучение их генетической характеристики представляется важным для отечественной науки и практики.

## Материалы и методы

В лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России исследовано 13 046 образов (мазки из носо- и ротоглотки) от больных острыми респираторными инфекциями, госпитализированных в СПб ГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина (n = 11 424), СПб ГБУЗ Детская городская больница Св. Ольги (n = 555), СПб ГБУЗ Детская городская клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова (n = 366) в период с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г.

Детекцию возбудителей ОРВИ, включая риновирусы, проводили методом ПЦР в режиме реального времени коммерческими наборами «АмплиСенс ® ОРВИ-скрин-FL» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Детекцию вируса гриппа также проводили методом ПЦР в режиме реального времени коммерческими наборами «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией произ-

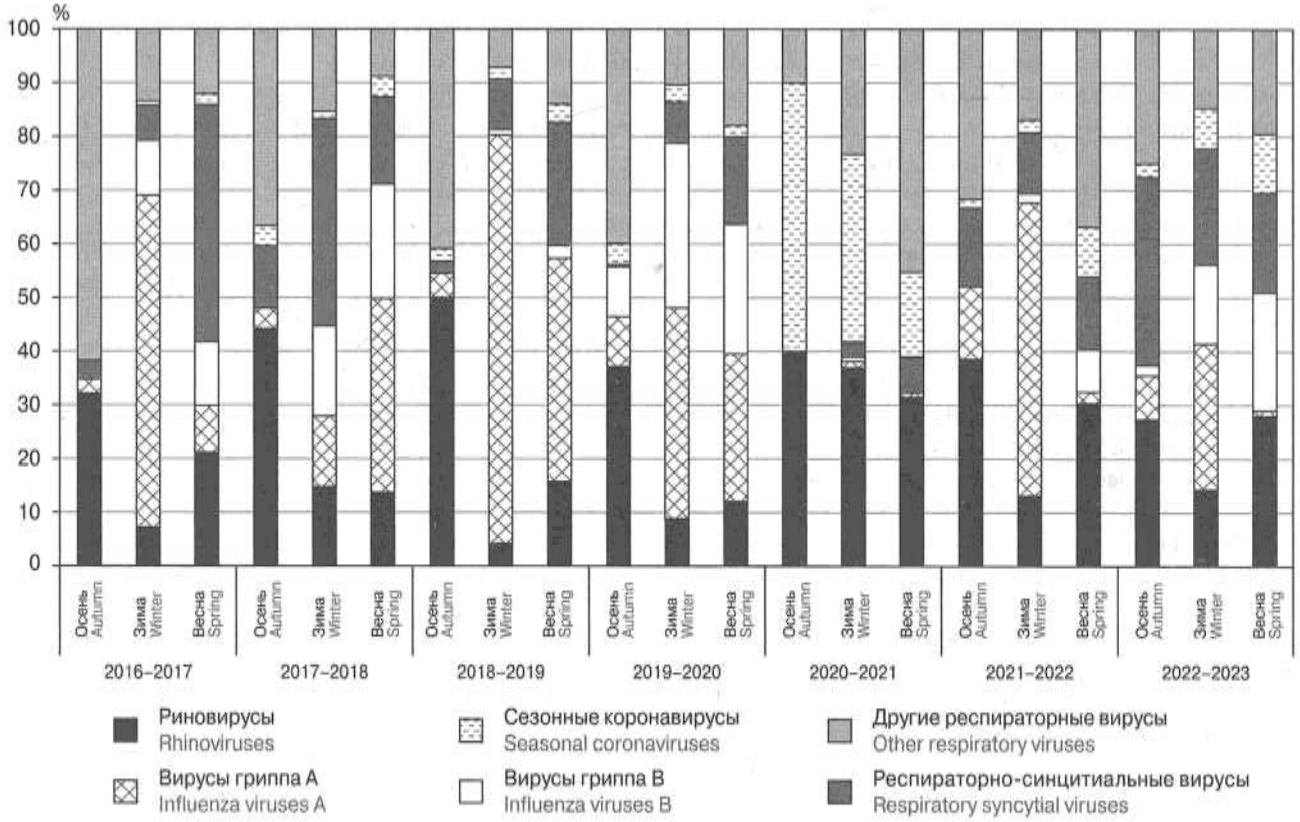


**Рисунок 1. Структура возбудителей ОРВИ в эпидемические сезоны с 2016–2017 до 2022–2023 гг. на территории Санкт-Петербурга (данные представлены без учета SARS-CoV-2)**

Figure 1. ARVI pathogen pattern in epidemics spanning from 2016–2017 to 2022–2023 in St. Petersburg (not including SARS-CoV-2)

водителя. Детекцию SARS-CoV-2 осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени набором «Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)», (Sansure Biotech Inc., КНР) в соответствии с инструкцией производителя. Исследование генетического разнообразия риновирусов осуществлялось капиллярным секвенированием с использованием праймеров, амплифицирующих область VP4/VP2 генома риновируса и разработанных da Costa Souza L. с соавт. [9].

Из базы данных GenBank для выравнивания полученных последовательностей были взяты полные геномы риновирусов. Выравнивание проводилось в программе MAFFT [22], филогенетическое дерево построено в программе RAxML [39], визуализация проводилась в FigTree.

## Результаты

Нами были собраны и проанализированы данные за семь сезонов эпидемического подъема заболеваемости ОРВИ с 2016–2017 по 2022–2023 гг. в Санкт-Петербурге, полученные в рамках надзора за гриппом и ОРВИ, проводимого лабораторией молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева. Согласно этим

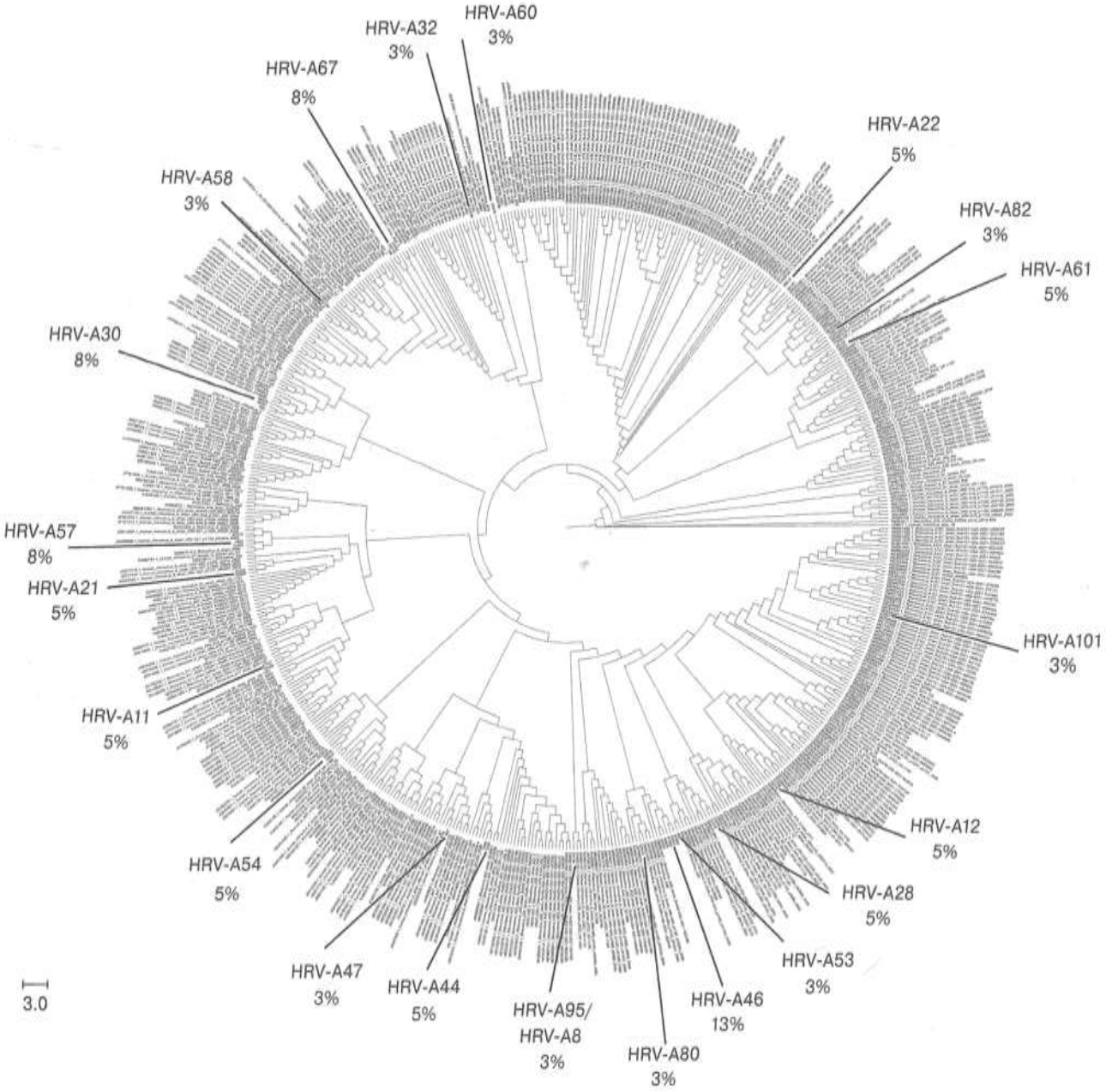


**Рисунок 2. Филогенетическое дерево, демонстрирующее генетическое разнообразие типов риновирусов А, выявленных в 2020–2021 гг. на территории Санкт-Петербурга**

Figure 2. Phylogenetic tree presenting genetic diversity of rhinovirus A types identified in 2020–2021 in St. Petersburg

данным, на территории Санкт-Петербурга риновирусы являлись одними из самых распространенных возбудителей негриппозной этиологии. Они циркулировали на протяжении всех эпидемических сезонов с преобладанием в осенний период (рис. 1). Следует отметить, что риновирусы продолжали активно циркулировать на фоне эпидемического распространения возбудителя COVID-19 (сезоны с 2020–2021 по 2022–2023 гг.), в том числе и в весенний период. При этом в первый пандемический период риновирусы циркулировали равномерно на протяжении всего сезона.

Из 13 046 исследованных образов выявлено 417 (3,2%) положительных на риновирус (пороговый цикл меньше или равен 26), из них лишь 71 (17,03%) риновирус был типирован.

Наиболее распространенными оказались риновирусы HRV-A — 55% (n = 39) от общего числа типированных образцов. Среди них обнаружен 21 тип. Наиболее распространенным типом оказался HRV-A46 — 13% (n = 5) вирусов, 15% (HRV-A30, HRV-A44 и HRV-A47, n = 6) относились к минорной группе риновирусов (рис. 2).

Риновирусы HRV-B и HRV-C были обнаружены в равном количестве — по 16 (23%). Среди HRV-B обнаружено 8 типов (рис. 3). Самым распространенным оказался HRV-B06 (n = 5, 31% от всех обнаруженных риновирусов вида B). Один не типировался (6%).

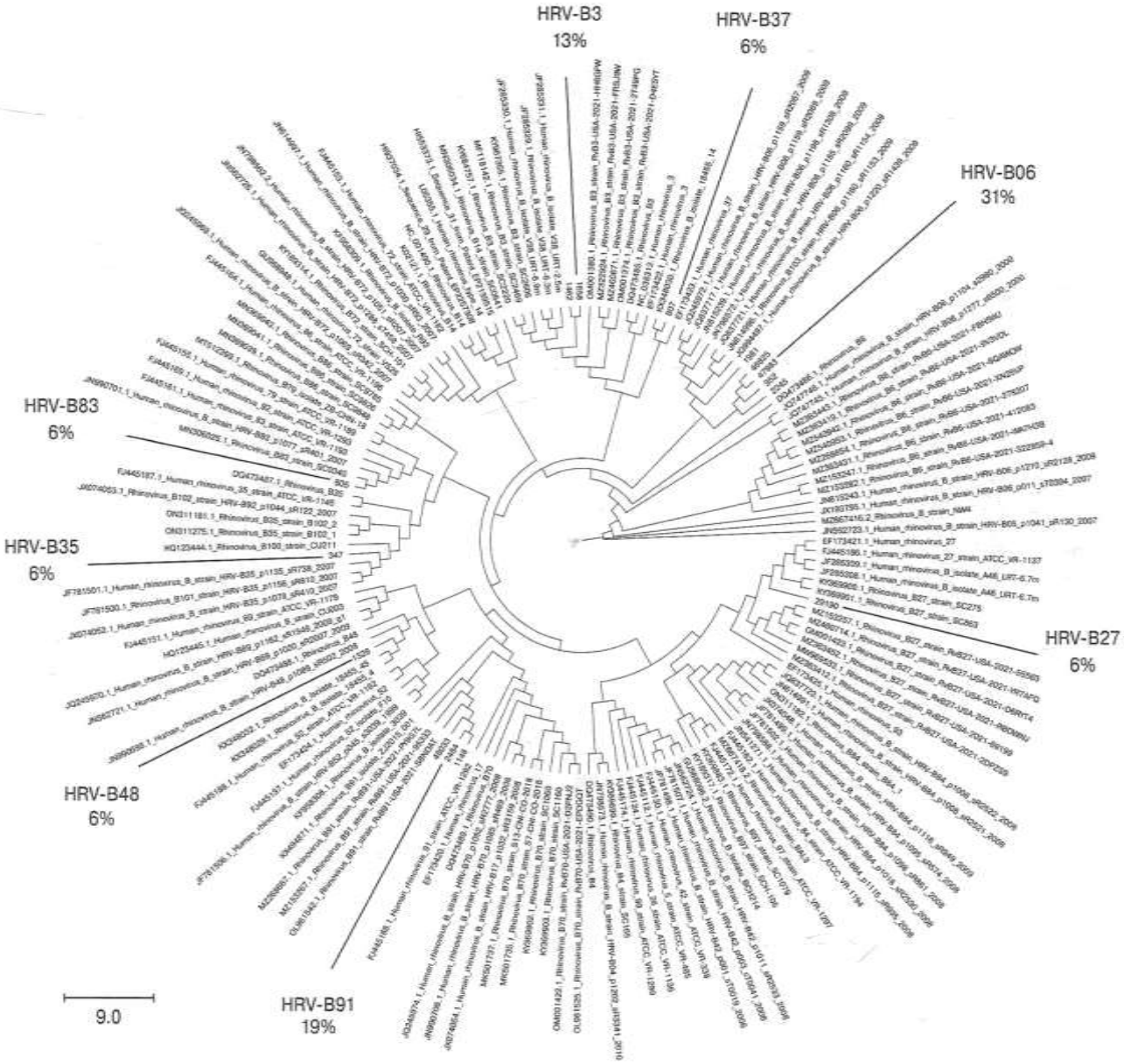


**Рисунок 3. Филогенетическое дерево, демонстрирующее генетическое разнообразие типов риновирусов B, выявленных в 2020–2021 гг. на территории Санкт-Петербурга**

Figure 3. Phylogenetic tree presenting genetic diversity of rhinovirus B types identified in 2020–2021 in St. Petersburg

Среди HRV-C обнаружено 7 типов, из них самыми распространенными были HRV-C42, HRV-C32 и HRV-C15 (по 19%, n = 3). Один образец (6%) не типировался (рис. 4).

В табл. 1 представлена возрастная характеристика пациентов, от которых были получены образцы. Вызывают интерес данные о взаимосвязи между возрастом пациентов и видом риновируса (табл. 2). Так, среди переболевших риновирусной инфекцией, вызванной HRV-A, преобладают пациенты в возрасте от 18 до 65 лет (57,5%), реже ее регистрировали у детей и подростков. HRV-C в основном обнаруживался у детей до 2 лет (43,75%) и взрослых 18–65 лет (31,25%). При этом HRV-B был обнаружен исключительно у взрослых пациентов (100%).

Нами были сопоставлены данные об установленном виде риновируса и диагнозе пациента (табл. 3). Так, HRV-A и HRV-C выявляли у больных с различными синдромами поражения верхних и нижних дыхательный путей (острый ринофарингит, ларинготрахеит, обструктивный бронхит, пневмония). Однако, риновирус HRV-B был выявлен лишь у пациентов старше 18 лет с клиническими проявлениями пневмонии.

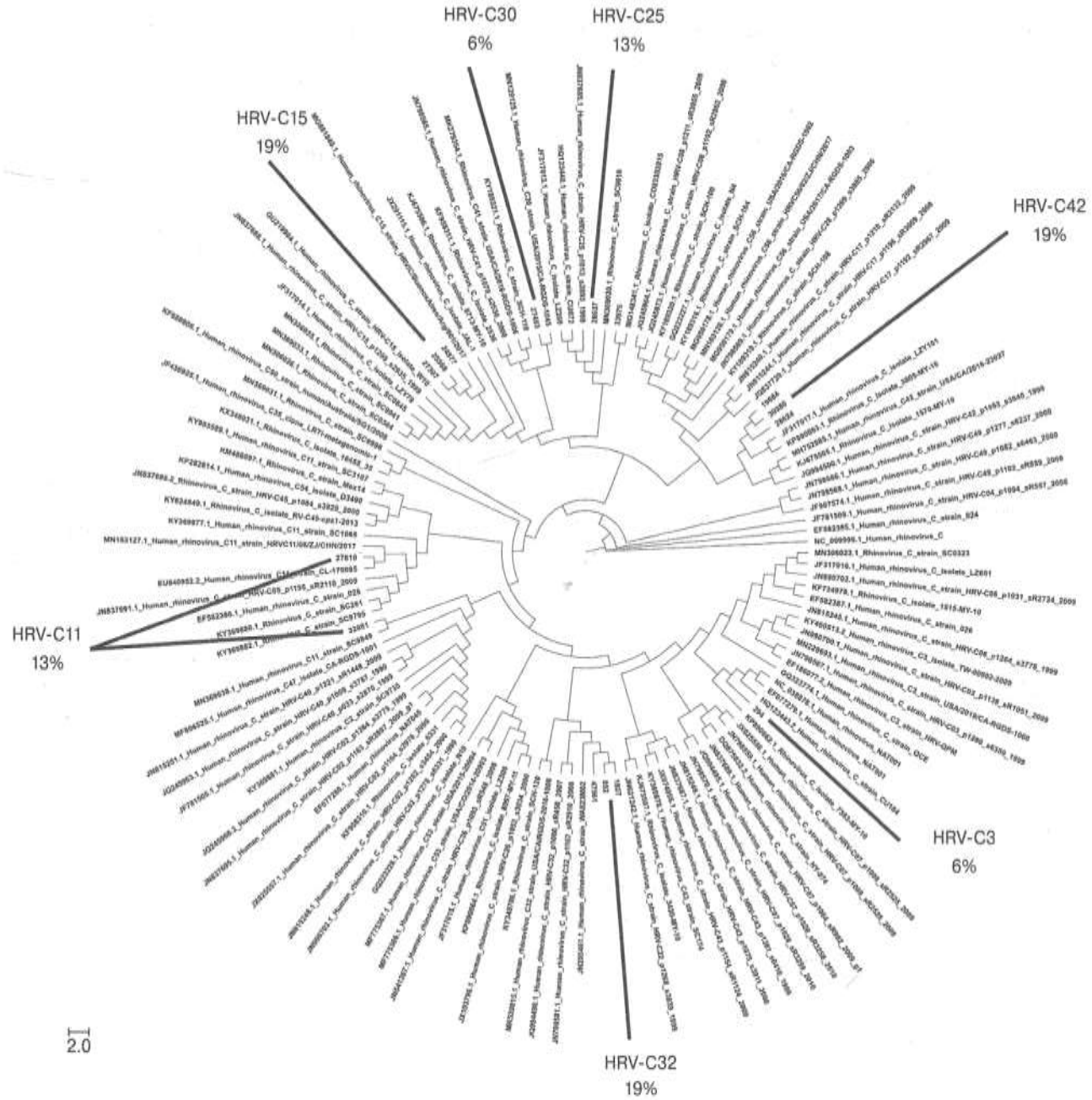


**Рисунок 4. Филогенетическое дерево, демонстрирующее генетическое разнообразие типов риновирусов C, выявленных в 2020–2021 гг. на территории Санкт-Петербурга**

Figure 4. Phylogenetic tree presenting genetic diversity of rhinovirus C types identified in 2020–2021 in St. Petersburg

**Таблица 1. Возрастная характеристика обследованных пациентов**
Table 1. Distribution of patient age groups

| Показатель Index | Возраст, лет Age, years | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0–2 | 3–6 | 7–14 | 15–18 | 18–65 | > 65 |
| **Доля возрастной группы от общего числа протестированных образцов, %** Percentage of age group in total tested samples, % | 2,6 (n = 333) | 3,0 (n = 388) | 2,3 (n = 290) | 1,2 (n = 159) | 69,0 (n = 8841) | 21,9 (n = 2800) |
| **Доля возрастной группы от общего числа положительных на риновирус, %** Percentage of age group in rhinovirus-positive total samples, % | 11,9 (n = 48) | 17,4 (n = 70) | 11,4 (n = 46) | 5,7 (n = 23) | 45,9 (n = 185) | 7,7 (n = 31) |

**Таблица 2. Процентное соотношение возрастных групп в зависимости от вида риновируса**
Table 2. Percentage of age groups related to rhinovirus type

| Вид риновирусов Rhinovirus species | Возраст, лет Age, years | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0–2 | 3–6 | 7–14 | 15–18 | 18–65 | > 65 |
| **HRV-A, %** | 12,5 (n = 5) | 10 (n = 4) | 12,5 (n = 5) | 2,5 (n= 1) | 57,5 (n = 23) | 5 (n = 2) |
| **HRV-B, %** | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 (n = 16) | 0 |
| **HRV-C, %** | 43,75 (n = 7) | 6,25 (n = 1) | 12,5 (n = 2) | 6,25 (n = 1) | 31,25 (n = 5) | 0 |

**Таблица 3. Диагнозы пациентов в соотношении с видами риновирусов**
Table 3. Diagnosis of patients in relation to rhinoviruses species

| Вид риновирусов Rhinovirus species | Диагноз, количество случаев Diagnosis, number of cases | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Пневмония** Pneumonia | **Обструктивный бронхит** Obstructive bronchitis | **Острый ринофарингит** Acute nasopharyngitis | **Ларинготрахеит** Laryngotracheitis | **Стеноз гортани** Stenosis of the larynx |
| **HRV-A** | 12 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| **HRV-B** | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **HRV-C** | 1 | 3 | 3 | 1 | 0 |

## Обсуждение

Esneau C. с соавт. [12] проанализировав 31 исследование, отмечают, что в «доковидный» период наиболее распространенным видом риновируса являлся А, второе место занимал риновирус С. Реже определяли риновирус В. В свою очередь, наиболее распространенными типами являются А-12, А-78 и С-2.

Полученные нами данные по Санкт-Петербургу также свидетельствуют о превалировании в циркуляции риновирусов вида А (55% среди типированных возбудителей риновирусной инфекции), что соответствует общемировой тенденции. Так же как и в других исследованиях, риновирусов вида В и С было детектировано значительно меньше [3, 9, 13].

Представляют интерес анализ циркуляции риновирусов в фоне эпидемии COVID-19 в Санкт-Петербурге. Известно, что распространение нового коронавируса SARS-CoV-2 сопровождалось существенным ограничением циркуляции целого ряда возбудителей сезонных респираторных инфекций, за исключением риновирусов и респираторно-синцитиального вируса [5]. Согласно полученным нами данным, в этот период самыми распространенными оказались риновирусы вида А, что соотносится с другими исследованиями [2, 21, 40].

Также нами установлены возрастные и клинические различия в зависимости от вида риновирусов. Так, HRV-A преобладают среди пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, HRV-C — в основном у детей до 2 лет и взрослых 18–65 лет. При этом HRV-B выявляли исключительно у пациентов старше 18 лет с проявлениями пневмонии, тогда как HRV-A и HRV-C у больных с поражением как верхних, так и нижних дыхательный путей.

Представленные нами результаты не позволяют в полной мере оценить генетическое разнообразие риновирусов, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга, вследствие малого количества типированных образцов. В настоящее время продолжается сбор данных, в том числе клинических, для определения возможной связи вида/типа риновируса и варианта течения риновирусной инфекции. Также разрабатывается подход к рутинному полногеномному секвенированию геномов риновирусов с использованием технологии амплификации SMART.

## Список литературы/References


1. Adam D.C., Chen X., Scotch M., MacIntyre C.R., Dwyer D., Kok J. The molecular epidemiology and clinical phylogenetics of rhinoviruses among paediatric cases in Sydney, Australia. *Int. J. Infect. Dis., 2021, vol. 110, pp. 69–74. doi: 10.1016/j.ijid.2021.06.046*
2. Alsayed A.R., Abed A., Abu-Samak M., Alshammari F., Alshammari B. Etiologies of acute bronchiolitis in children at risk for asthma, with emphasis on the human rhinovirus genotyping protocol. *J. Clin. Med., 2023, vol. 12, no. 12: 3909. doi: 10.3390/jcm12123909*
3. Baillie V.L., Moore D.P., Mathunjwa A., Morailane P., Simões E.A.F., Madhi S.A. Molecular subtyping of human rhinovirus in children from three Sub-Saharan african countries. *J. Clin. Microbiol., 2019, vol. 57, no. 9: e00723-19. doi: 10.1128/jcm.00723-19*
4. Bochkov Y.A., Watters K., Ashraf S., Griggs T.F., Devries M.K., Jackson D.J., Palmenberg A.C., Gern J.E. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2015, vol. 112, no. 17, pp. 5485–5490. doi: 10.1073/pnas.1421178112*
5. Calderaro A., De Conto F., Buttrini M., Piccolo G., Montecchini S., Maccari C., Martinelli M., Di Maio A., Ferraglia F., Pinardi F., Montagna P., Arcangeletti M.C., Chezzi C. Human respiratory viruses, including SARS-CoV-2, circulating in the winter season 2019-2020 in Parma, Northern Italy. *Int. J. Infect. Dis., 2021, vol. 102, pp. 79–84. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.1473*
6. Cho G.S., Moon B.J., Lee B.J., Gong C.H., Kim N.H., Kim Y.S., Kim H.S., Jang Y.J. High rates of detection of respiratory viruses in the nasal washes and mucosae of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Clin. Microbiol., 2013, vol. 51, no. 3, pp. 979–984. doi: 10.1128/jcm.02806-12*
7. Chonmaitree T., Alvarez-Fernandez P., Jennings K., Trujillo R., Marom T., Loeffelholz M.J., Miller A.L., McCormick D.P., Patel J.A., Pyles R.B. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: association with acute otitis media development. *Clin. Infect. Dis., 2015, vol. 60, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1093/cid/ciu714*
8. Current International Committee on Taxonomy of Viruses Taxonomy 2022 Release. *URL: https://ictv.global/taxonomy (20.06.23)*
9. Da Costa Souza L., Bello E.J.M., Dos Santos E.M., Nagata T. Molecular and clinical characteristics related to rhinovirus infection in Brasília, Brazil. *Braz. J. Microbiol., 2021, vol. 52, no. 1, pp. 289–298. doi: 10.1007/s42770-020-00411-0*
10. Easom N., Moss P., Barlow G., Samson A., Taynton T., Adams K., Ivan M., Burns P., Gajee K., Eastick K., Lillie P.J. Sixty-eight consecutive patients assessed for COVID-19 infection: experience from a UK regional infectious diseases unit. *Influenza Other Respir Viruses, 2020, vol. 14, no. 4, pp. 374–379. doi: 10.1111/irv.12739*
11. Emanuels A., Heimonen J., O'Hanlon J., Kim A.E., Wilcox N., McCulloch D.J., Brandstetter E., Wolf C.R., Logue J.K., Han P.D., Pfau B., Newman K.L., Hughes J.P., Jackson M.L., Uyeki T.M., Boeckh M., Starita L.M., Nickerson D.A., Bedford T., Englund J.A., Chu H.Y. Remote household observation for noninfluenza respiratory viral illness. *Clin. Infect. Dis., 2021, vol. 73, no. 11, pp. 4411–4418. doi: 10.1093/cid/ciaa1719*
12. Esneau C., Duff A.C., Bartlett N.W. Understanding rhinovirus circulation and impact on illness. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 1: 141. doi: 10.3390/v14010141*
13. Esposito S., Daleno C., Baggi E., Ciarmoli E., Lavizzari A., Pierro M., Semino M., Groppo M., Scala A., Terranova L., Galeone C., Principi N. Circulation of different rhinovirus groups among children with lower respiratory tract infection in Kiremba, Burundi. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis., 2012, vol. 31, no. 11, pp. 3251–3256. doi: 10.1007/s10096-012-1692-9*
14. Fawkner-Corbett D.W., Khoo S.K., Duarte C.M., Bezerra P.G., Bochkov Y.A., Gern J.E., Le Souef P.N., McNamara P.S. Rhinovirus-C detection in children presenting with acute respiratory infection to hospital in Brazil. *J. Med. Virol., 2016, vol. 88, no. 1, pp. 58–63. doi: 10.1002/jmv.24300*
15. Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Yost S.C., Marlor C.W., Kamarck M.E., McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell, 1989, vol. 56, no. 5, pp. 839–847. doi: 10.1016/0092-8674(89)90688-0*
16. Iwane M.K., Prill M.M., Lu X., Miller E.K., Edwards K.M., Hall C.B., Griffin M.R., Staat M.A., Anderson L.J., Williams J.V., Weinberg G.A., Ali A., Szilagyi P.G., Zhu Y., Erdman D.D. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J. Infect. Dis., 2011, vol. 204, no. 11, pp. 1702–1710. doi: 10.1093/infdis/jir634*
17. Jacobs S.E., Lamson D.M., St George K., Walsh T.J. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev., 2013, vol. 26, no. 1, pp. 135–162. doi: 10.1128/cmr.00077-12*
18. Jain S., Self W.H., Wunderink R.G., Fakhran S., Balk R., Bramley A.M., Reed C., Grijalva C.G., Anderson E.J., Courtney D.M., Chappell J.D., Qi C., Hart E.M., Carroll F., Trabue C., Donnelly H.K., Williams D.J., Zhu Y., Arnold S.R., Ampofo K., Waterer G.W., Levine M., Lindstrom S., Winchell J.M., Katz J.M., Erdman D., Schneider E., Hicks L.A., McCullers J.A., Pavia A.T., Edwards K.M., Finelli L.; CDC EPIC Study Team. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N. Engl. J. Med., 2015, vol. 373, no. 5, pp. 415–427. doi: 10.1056/NEJMoa1500245*

19. Jain S., Williams D.J., Arnold S.R., Ampofo K., Bramley A.M., Reed C., Stockmann C., Anderson E.J., Grijalva C.G., Self W.H., Zhu Y., Patel A., Hymas W., Chappell J.D., Kaufman R.A., Kan J.H., Dansie D., Lenny N, Hillyard D.R., Haynes L.M, Levine M., Lindstrom S., Winchell J.M., Katz J.M., Erdman D., Schneider E., Hicks L.A., Wunderink R.G., Edwards K.M., Pavia A.T., McCullers J.A., Finelli L.; CDC EPIC Study Team. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N. Engl. J. Med., 2015, vol. 372, no. 9, pp. 835–845. doi: 10.1056/NEJMoa1405870*
20. Jensen L.M., Walker E.J., Jans D.A., Ghildyal R. Proteases of human rhinovirus: role in infection. *Methods Mol. Biol., 2015, vol. 1221, pp. 129–141. doi: 10.1007/978-1-4939-1571-2_10*
21. Jiang H., Yang T., Yang C., Lu Y., Yi Z., Zhang Q., Wang W. Molecular epidemiology and clinical characterization of human rhinoviruses circulating in Shanghai, 2012–2020. *Arch. Virol., 2022, vol. 167, no. 4, pp. 1111–1123. doi: 10.1007/s00705-022-05405-x*
22. Katoh K., Rozewicki J., Yamada D.K. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics, vol. 20, no. 4, pp. 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108*
23. Kim D., Quinn J., Pinsky B., Shah N.H., Brown I. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA, 2020, vol. 323, no. 20, pp. 2085–2086. doi: 10.1001/jama.2020.6266*
24. Lu Q.B., Wo Y., Wang L.Y., Wang H.Y., Huang D.D., Zhang X.A., Liu W., Cao W.C. Molecular epidemiology of human rhinovirus in children with acute respiratory diseases in Chongqing, China. *Sci. Rep., 2014, vol. 4: 6686. doi: 10.1038/srep06686*
25. Mancino E., Cristiani L., Pierangeli A., Scagnolari C., Nenna R., Petrarca L., Di Mattia G., La Regina D., Frassanito A., Oliveto G., Viscido A., Midulla F. A single centre study of viral community-acquired pneumonia in children: no evidence of SARS-CoV-2 from October 2019 to March 2020. *J. Clin. Virol., 2020, vol. 128: 104385. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104385*
26. Marriott D., Beresford R., Mirdad F., Stark D., Glanville A., Chapman S., Harkness J., Dore G.J, Andresen D., Matthews G.V., Concomitant marked decline in prevalence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and other respiratory viruses among symptomatic patients following Public Health interventions in Australia: Data from St Vincent's hospital and associated screening clinics, Sydney, NSW. *Clin. Infect. Dis., 2021, vol. 72, no. 10, pp. 649–651. doi: 10.1093/cid/ciaa1256*
27. Matos A.D.R., Motta F.C., Caetano B.C., Ogrzewalska M., Garcia C.C., Lopes J.C.O., Miranda M., Livorati M.T.F.P., Abreu A., Brown D., Siqueira M.M. Identification of SARS-CoV-2 and additional respiratory pathogens cases under the investigation of COVID-19 initial phase in a Brazilian reference laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2020, vol. 115: 200232. doi: 10.1590/0074-02760200232*
28. Melé M., Henares D., Pino R., Asenjo S., Matamoros R., Fumadó V., Fortuny C., García-García J.J., Jordan I., Brotons P., Muñoz-Almagro C., de-Sevilla M.F., Launes C. Kids-Corona Paediatric Hospitalist group. Low impact of SARS-CoV-2 infection among paediatric acute respiratory disease hospitalizations. *J. Infect., 2021, vol. 82, no. 3, pp. 414–451. doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.013*
29. Miller E.K, Linder J., Kraft D., Johnson M., Lu P., Saville B.R., Williams J.V., Griffin M.R., Talbot H.K. Hospitalizations and outpatient visits for rhinovirus-associated acute respiratory illness in adults. *J. Allergy Clin. Immunol., 2016, vol. 137, no. 3, pp. 734–743.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.017*
30. Miller E.K., Edwards K.M., Weinberg G.A., Iwane M.K., Griffin M.R., Hall C.B., Zhu Y., Szilagyi P.G., Morin L.L., Heil L.H., Lu X., Williams J.V.; New Vaccine Surveillance Network. A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. *J. Allergy Clin. Immunol., 2009, vol. 123, no. 1, pp. 98–104.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2008.10.007*
31. Miller E.K., Gebretsadik T., Carroll K.N., Dupont W.D., Mohamed Y.A., Morin L.L., Heil L., Minton P.A., Woodward K., Liu Z., Hartert T.V., Williams J.V. Viral etiologies of infant bronchiolitis, croup and upper respiratory illness during 4 consecutive years. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2013, vol. 32, no. 9, pp. 950–955. doi: 10.1097/INF.0b013e31829b7e43*
32. Nowak M.D., Sordillo E.M., Gitman M.R., Paniz Mondolfi A.E. Coinfection in SARS-CoV-2 infected patients: where are influenza virus and rhinovirus/enterovirus? *J. Med. Virol., 2020, vol. 92, no. 10, pp. 699–1700. doi: 10.1002/jmv.25953*
33. Panning M., Wiener J., Rothe K., Schneider J., Pletz M.W., Rohde G., Rupp J., Witzenrath M., Spinner C.D. Members of the CAPNETZ study group. No SARS-CoV-2 detection in the German CAPNETZ cohort of community acquired pneumonia before COVID-19 peak in March 2020. *Infection, 2020, vol. 48, no. 6, pp. 971–974.*
34. Panning M., Wiener J., Rothe K., Schneider J., Pletz M.W., Rohde G., Rupp J., Witzenrath M., Spinner C.D.; Members of the CAPNETZ study group. No SARS-CoV-2 detection in the German CAPNETZ cohort of community acquired pneumonia before COVID-19 peak in March 2020. *Infection, 2020, vol. 48, no. 6, pp. 971–974. doi: 10.1007/s15010-020-01471-y*
35. Rhinoviruses. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Eds: Jans D.A., Ghildyal R. *Springer, Hatfield, Hertfordshire, UK, 2015, vol. 1221. 190 p.*
36. Simmonds P., Gorbalenya A.E., Harvala H., Hovi T., Knowles N.J., Lindberg A.M., Oberste M.S., Palmenberg A.C., Reuter G., Skern T., Tapparel C., Wolthers K.C., Woo P.C.Y., Zell R. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch. Virol., 2020, vol. 165, no. 3, pp. 793–797. doi: 10.1007/s00705-019-04520-6*
37. Sominina A., Danilenko D., Komissarov A., Pisareva M., Musaeva T., Bakaev M., Afanasieva O., Stolyarov K., Smorodintseva E., Rozhkova E., Obraztsova E., Dondurey E., Guzhov D., Timonina V., Golovacheva E., Kurskaya O., Shestopalov A., Smirnova S., Alimov A., Lioznov D. Age-specific etiology of severe acute respiratory infections and influenza vaccine effectivity in prevention of hospitalization in Russia, 2018–2019 season. *J. Epidemiol. Glob. Health, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 413–425. doi: 10.1007/s44197-021-00009-1*
38. Sominina A.A., Danilenko D.M., Stolyarov K.A., Karpova L.S., Bakaev M.I., Levanyuk T.P., Burtseva E.I., Lioznov D.A. Interference of SARS-CoV-2 with other respiratory viral infections agents during pandemic. *Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2021, vol. 20, no. 4, pp. 28–39. doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-4-28-39*
39. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics, 2014, vol. 30, no. 9, pp. 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033*

40. Thongpan I., Vichaiwattana P., Vongpunsawad S., Poovorawan Y. Upsurge of human rhinovirus infection followed by a delayed seasonal respiratory syncytial virus infection in Thai children during the coronavirus pandemic. *Influenza Other Respir. Viruses, 2021, vol. 15, no. 6, pp. 711–720. doi: 10.1111/irv.12893*
41. Wehrhahn M.C., Robson J., Brown S., Bursle E., Byrne S., New D., Chong S., Newcombe J.P., Siversten T., Hadlow N. Self-collection: an appropriate alternative during the SARS-CoV-2 pandemic. *J. Clin. Virol., 2020, vol. 128: 104417. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104417*
42. Zlateva K.T., van Rijn A.L., Simmonds P., Coenjaerts F.E.J., van Loon A.M., Verheij T.J.M., de Vries J.J.C., Little P., Butler C.C., van Zwet E.W., Goossens H., Ieven M., Claas E.C.J.; GRACE Study Group. Molecular epidemiology and clinical impact of rhinovirus infections in adults during three epidemic seasons in 11 European countries (2007–2010). *Thorax, 2020, vol. 75, no. 10, pp. 882–890.*

**Авторы:**
**Ксенафонтов А.Д.**, аспирант, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной вирусологии отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;
**Писарева М.М.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;
**Едер В.А.**, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;
**Мусаева Т.Д.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;
**Фадеев А.В.**, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;
**Комиссаров А.Б.**, зав. лабораторией молекулярной вирусологии отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;
**Киселева И.В.**, д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; старший преподаватель учебного отдела ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;
**Лиознов Д.А.**, д.м.н., профессор, директор ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**
**Ksenafontov A.D.**, PhD Student, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Virology, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Pisareva M.M.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Eder V.A.**, DSc (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Musaeva T.D.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Fadeev A.V.**, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Komissarov A.B.**, Head of the Laboratory of Molecular Virology, Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Kiseleva I.V.**, DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Lecturer, Department of Education, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
**Lioznov D.A.**, DSc (Medicine), Professor, Director of Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.08.2023
Принята к печати 28.08.2023

Received 04.08.2023
Accepted 28.08.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 754–760

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 754–760

# COMPARISON OF THE LEVEL OF VITAMIN D IN PRETERM INFECTED AND UNINFECTED INFANTS

**M. Zakerihamidi[a], H. Boskabadi[b], R. Faramarzi[b]**

[a] *Islamic Azad University, Tonekabon, Iran*
[b] *Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

**Abstract.** *Introduction.* Despite the substantial progress in intensive cares, sepsis is still an important cause of neonatal mortality. Given the role of vitamin D in infection control, this study was conducted to compare vitamin D level in infected and uninfected preterm infants. *Materials and methods.* This cross-sectional study was carried out on 87 preterm infants (45 infected infants and 42 uninfected infants) hospitalized in Mashhad Ghaem Hospital, Iran, during 2015–2017. The subjects were selected by using convenience sampling. The infected infants (n = 45) included babies with clinical and laboratory findings compatible with infection and/or positive blood or cerebrospinal fluid cultures. The serum levels vitamin D were measured in all infants. A researcher-made questionnaire containing demographic, clinical and laboratory features of infants was used. In addition, independent t-test and chi-square test were applied. SPSS was used to perform the statistical data analysis. *Results.* 83% of infants had vitamin D deficiency 34.5%, 26.4%, and 21.8% of whom exhibited severe (less than 10 ng/ml), moderate (10.1–20 ng/ml), mild deficiency (20.1–30 ng/ml), respectively. The mean vitamin D level of infants was 23.31±9.40 ng/ml in the control group and 11.02±8.64 ng/ml in the case group (p = 0.000). In the case group, the mean vitamin D was 8.14±5.53 ng/ml in early sepsis and 12.62±9.75 ng/ml in late-onset sepsis (p = 0.121). 95% of infected infants and 71% of uninfected infants had vitamin D less than 30 ng/ml (p = 0.003). *Conclusion.* Vitamin D deficiency is very common in preterm infants. Serum vitamin D levels in infants with sepsis were lower than those in uninfected infants. Therefore, the correction of vitamin D deficiency may contribute to better control of neonatal infection.

***Key words:*** *preterm infants, vitamin D, sepsis, meningitis, infection, neonates.*

## СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ВИТАМИНА D У НЕДОНОШЕННЫХ ИНФИЦИРОВАННЫХ И НЕИНФИЦИРОВАННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

**Закерихамиди М.[1], Боскабади Х.[2], Фарамарзи Р.[2]**

[1] *Исламский университет Азад, г. Тонкабон, Иран*
[2] *Мешхедский университет медицинских наук, г. Мешхед, Иран*

**Резюме.** *Введение.* Несмотря на значительный прогресс в области интенсивной терапии, сепсис по-прежнему остается одной из основных причин неонатальной смертности. Поскольку уровень витамина D влияет на тяжесть течения инфекций, в настоящем исследовании было проведено сравнение уровня витамина D у инфицированных и неинфицированных недоношенных детей. *Материалы и методы.* Проведено поперечное исследование 87 недоношенных новорожденных (45 инфицированных и 42 неинфицированных младенца), госпитализированных в больницу Мешхед Гаем, Иран, в период с 2015 по 2017 г. Отбор пациентов осуществлялся

**Адрес для переписки:**
Хасан Боскабади
Мешхедский университет медицинских наук, медицинский факультет, кафедра педиатрии, г. Мешхед, Иран.
Тел.: +98-511-8412069. Факс: +98-511-8417451.
E-mail: boskabadih@mums.ac.ir

**Contacts:**
Hassan Boskabadi
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Phone: +98-511-8412069. Fax: +98-511-8417451.
E-mail: boskabadih@mums.ac.ir

**Для цитирования:**
Закерихамиди М., Боскабади Х., Фарамарзи Р. Сравнение уровня витамина D у недоношенных инфицированных и неинфицированных новорожденных // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 754–760. doi: 10.15789/2220-7619-COT-8050

**Citation:**
Zakerihamidi M., Boskabadi H., Faramarzi R. Comparison of the level of vitamin D in preterm infected and uninfected infants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 754–760. doi: 10.15789/2220-7619-COT-8050



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-COT-8050

методом случайной выборки. В группу инфицированных (n = 45) были включены младенцы с клиническими и лабораторными данными, соответствующими инфекции, и/или положительными высевами крови или спинномозговой жидкости. Уровни витамина D в сыворотке крови определяли у всех младенцев. Была использована разработанная нами анкета, содержащая демографические, клинические и лабораторные данные младенцев. Статистическая обработка данных проводилась в программе SPSS и включала оценку независимого t-критерия и критерия хи-квадрат. *Результаты.* У 83% младенцев был выявлен дефицит витамина D, при этом у 34,5, 26,4 и 21,8% установлена тяжелая (менее 10 нг/мл), умеренная (10,1–20 нг/мл) и легкая степень дефицита (20,1–30 нг/мл) соответственно. Средний уровень содержания витамина D у младенцев составил 23,31±9,40 нг/мл в контрольной группе и 11,02±8,64 нг/мл в основной (p = 0,000). При раннем и позднем сепсисе в основной группе средний уровень витамина D составил 8,14±5,53 и 12,62±9,75 нг/мл (p = 0,121) соответственно. У 95% инфицированных и 71% неинфицированных младенцев уровень витамина D был менее 30 нг/мл (p = 0,003). *Выводы.* Дефицит витамина D встречается у недоношенных детей довольно часто. Уровень витамина D в сыворотке крови у недоношенных новорожденных с сепсисом был ниже, чем у неинфицированных. Следовательно, коррекция дефицита витамина D может препятствовать развитию тяжелых форм неонатальной инфекции.

***Ключевые слова:*** *недоношенные дети, витамин D, сепсис, менингит, инфекционное заболевание, новорожденные.*

## Introduction

Neonatal sepsis, a serious disease with high mortality, remains a major challenge for neonatologist due to both non-specific symptoms and the lack of a definitive early diagnostic test. This condition leads to increased length of stay and higher treatment costs for families, communities and health systems, especially in developing countries with limited neonatal intensive care resources, limited space, and personnel [6].

The prevalence of neonatal bacterial sepsis varies from 1 to 4 cases per 1000 live births. It is estimated to be higher in the preterm infants, with at least 21% experiencing at least one episode of infection. Infections account for about one-quarter of causes of mortality in Mashhad Ghaem Hospital [6, 24, 31, 33]. Identifying risk factors for neonatal infections and making proper corrections can play a significant role in infection control. Prematurity is undoubtedly the most important risk factor for neonatal infection and immune system immaturity is a major predisposing factor for infection in preterm infants. Cellular and humoral defense mechanisms have not still yet developed sufficiently in preterm infants, and neutrophils are deficient in both quality and quantity [30].

Vitamin D, a fat-soluble vitamin, play a role in calcium metabolism and bone mineralization, as well as having a regulatory role in the immune system function, including macrophage [25]. Vitamin D is essential for proper functioning of the innate immune system via peptides in epithelial cells, neutrophils and macrophages [25, 30].

The mechanical barrier of skin and other epithelial surfaces are among the first protective barriers against infection, and activated vitamin D plays a vital role in maintaining the integrity of epithelial cells [5].

Prematurity is associated with an increased risk of vitamin D deficiency. Vitamin D deficiency (serum 25-hydroxy vitamin D level less than 50 nmol/L) differ between preterm infants worldwide, with 64%, 83% and 82% of preterm infants with vitamin D deficiency reported in America, India and Iran, respectively. Low vitamin D levels are associated with intrauterine growth retardation, preterm delivery, hypertension, and neonatal complications during pregnancy [6, 15].

Some studies have reported that insufficient vitamin D (deficiency and inadequacy) is one of the important causes of acute respiratory tract infection in infants and children [13, 32, 34]. There has been an association of vitamin D deficiency with respiratory syncytial virus infection during infancy [33]. On the other hand, vitamins and micronutrients can play an important role in supporting the human immune system, and their homeostasis is key in the response to infection. Micronutrient inadequacies and deficiencies constitute a global health issue, particularly among countries in the Middle East [2]. The deficiency of vitamins A and D is very common in mothers and children due to improper diet and the loss of these materials during periods of recurrent infection particularly in the Middle East and Asia [10, 17].

Vitamin D deficiency can be considered as one reason for weak immune system in preterm infants, leading to the prevalence of infection with increasing age through weakening innate and specific immune system. Given the high prevalence of infection in infants, especially in preterm infants and the possible role of vitamin D in immune system function; this study aimed to investigate the relationship between incidence of infection and vitamin D level in preterm infants.

## Materials and methods

This cross-sectional study was carried out on 87 preterm infants with a birth weight of less than 2000 g or gestational age less than 34 weeks, hospitalized in Neonatal Intensive Care Unit (NICU) at Mashhad Ghaem Hospital, Iran, between 2015 and 2017. The subjects were selected through convenience sampling. After obtaining ethical approval and written informed consent from the parents, infants with clearly congenital anomalies, death in the delivery room, maternal substance abuse, and severe asphyxia were excluded from the study.

A 1.5 cc blood sample from the umbilical cord was collected following the birth. The prepared samples were centrifuged, and their serum was stored at –20°C and sent for laboratory evaluation. Vitamin D levels were measured using an Elisa Reader RT2100c (Germany) and Elisa Washing machine with the ELISA method. Vitamin D levels of the infants were divided into four categories: severe (25-hydroxy vitamin D level of less than 10 ng/ml), moderate (10.1–20 ng/ml), mild deficiency (20.1–30 ng/ml), and normal (> 30.1 ng/ml). Demographic characteristics of infants including birth age, sex, and birth weight were recorded in a checklist developed by the researcher. Apgar scores, need for resuscitation, intrauterine growth restriction, asphyxia, respiratory distress, blood culture, spinal cerebrospinal fluid culture, CBC, the number of blood platelets, ESR, C-reactive protein (CRP), intraventricular hemorrhage (IVH) and Respiratory distress syndrome (RDS) were recorded in the checklist. Then, the infants were followed up until hospital discharge, and if there was a clinical or definitely infection, they were followed up. The uninfected and infected infants groups were compared in terms of serum levels of vitamin D

Generally, definitive infection included the infants with positive blood culture (sepsis) or cerebrospinal fluid (CSF) (meningitis) and urine (urinary tract infection). Cases with CSF liquid cytology, white blood cells (WBC) > 30 with preferring neutrophil with or without protein > 150 mg/dl, and sugar less than 35 mg/dl were considered as cytological meningitis. Clinical sepsis was defined as two clinical signs accompanying (lethargy, apnea, respiratory distress, restlessness, seizures, need for mechanical ventilation, abdominal distention, hypotension and food intolerance) and two laboratory signs (20 000 ≤ WBC or ≤ 5000), thrombocytopenia (Plt ≤ 150 000/μL) and CRP ≥ 10 mg/dl)) without a positive culture. When the positive cultures were taken, early and late-onset sepsis were considered after the first three days. After collecting data and inputting it into SPSS, the study was examined using tables, diagrams, and statistical indicators. In order to evaluate the relationships among variables after controlling the normality, an independent t-test was used for normal cases. Chi-square test was used to analyze the relationships among variables with the nominal scale. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, US). Depending on their distribution, the data were presented as mean and standard deviation or as median and interquartile range. Frequency measures were presented as numbers (n) and frequencies (%). Demographic characteristics were compared between the infection group and control groups. The independent sample t-test was used for normally distributed variables and the Mann–Whitney U-test was used for non-normally distributed variables to determine differences between the two groups. P values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## Results

Of the 87 cases, 45 (51.7%) of uninfected infants were in the control group, and 42 (48.3%) of infected infants were in the case group. The infants in the case group included 24 (27.6%) with sepsis, 3 (3.4%) with meningitis, 7 (8%) with meningitis plus sepsis, 4 (4.6%) with cytological meningitis, and 4 (4.6%) with clinical infection. Among the infants, 15 (35.7%) had early-onset infection and 27 (64.3%) had late-onset infection. The most common causes of admission were prematurity (66.7%) and respiratory problems, and the common diagnoses were prematurity, respiratory distress syndrome and infection.

In the present study, vitamin D levels of the infants evaluated showed that 83% of them had vitamin D deficiency, of whom 34.5%, 26.4%, 21.8%, and had severe (less than 10 ng/ml), moderate (10.1–20 ng/ml) and mild deficiency (20.1–30 ng/ml), respectively, and17.2% of cases were normal (30.1–45 ng/ml).

The mean birth weight of infants was 1395.51± 357.53 g in the control group and 1266.71±280.73 g in the case group (p = 0.078). The other features of the study subjects are given in Table 1.

No statistically significant difference were detected between the two groups with respect to WBC (p = 0.802), neutrophils (p = 0.590), lymphocytes (p = 0.450), ESR (p = 0.871), Plt (p = 0.238), hematocrit (p = 0.070), height (p = 0.127), weight (p = 0.078) and gestational age (p = 0.056) (p > 0.05, Table 2).

Statistically significant differences were found between the two groups in terms of CRP (p = 0.025) and serum vitamin D (p = 0.001), i.e. vitamin D, first minute Apgar scores, fifth-minute Apgar scores, and head circumference were higher while CRP of infants was lower in the control group (Table 1).

The mean vitamin D level of infants was 23.31±9.40 ng/ml in the control group and 11.02±8.64 ng/ml in the case group (p = 0.000). In the case group, the mean vitamin D was 8.14±5.53 ng/ml in early sepsis and 12.62±9.75 ng/ml in late-onset sepsis (p = 0.121).

Brain ultrasonography demonstrated intracranial hemorrhage in 4/45% of infants in the control group and 40% of ones in the case group (p = 0.021). There was positive culture in 32.5% of infants on the first day (p = 0.000) and 65.52% of infants after the third day (p = 0.000) in the case group (Table 2).

The mean serum vitamin D levels in infected infants were lower than those in the uninfected cases, with rate 5.30±1.65 ng/ml in the clinical infection and 7.10±2.15 ng/ml in the available cases along with sepsis plus meningitis (Table 3).

**Table 1. Comparing the mean infant variables in the two control and case groups**

| Variables | Infants in the control group 45 (51.7) infants | Infants in the case group 42 (48.3) infants | Level of significance (T-test) |
|---|---|---|---|
| CRP | 5.4±11.5 | 30.50±48.05 | 0.035* |
| ESR | 8.80±3.70 | 7.11±2.10 | 0.871 |
| WBC | 11.66±5.17 | 12.34±7.43 | 0.802 |
| Neutrophils (%) | 45.00±7.07 | 51.14±15.18 | 0.590 |
| Lymphocytes (%) | 50.50±4.94 | 41.35±16.08 | 0.450 |
| Platelets (μL) | 330 084±76 026 | 370 180±61 132 | 0.238 |
| Hematocrit (g/dl) | 46.97±3.26 | 42.12±6.70 | 0.070 |
| Vitamin D for infant (ng/ml) | 21.23±9.83 | 11.47±11.35 | 0.001 |
| Gestational age (weeks) | 31.7442±2.08 | 30.7250±2.64 | 0.056 |
| First minute Apgar score | 7.29±1.48 | 6.15±2.02 | 0.005 |
| Fifth minute Apgar score | 8.62±1.12 | 7.73±1.55 | 0.004 |
| Height (cm) | 40.57±2.77 | 39.53±2.75 | 0.127 |
| Head circumference (cm) | 29.37±1.58 | 28.13±2.30 | 0.016 |
| Weight (g) | 1395.51±357.53 | 1266.71±280.73 | 0.078 |

**Note.** *Value is expressed as median±IQR. Others values are expressed as means±SD.

According to the results of this study, the incidence of infection reduced in infants as vitamin D levels increased (Fig.).

40 (95/2%) and 2 (4.8%) infected cases had vitamin D levels less and higher than 30 ngml while in the control group, 32 (71.1%) and 13 (28.9%) infants had low and normal vitamin D levels ($p = 0.003$).

## Discussion

According to the results of the study, over four-fifth of preterm infants had Vitamin D deficiency, with 29%, 34%, and 14% experiencing severe, moderate, and mild deficiency, respectively. In the study by Park et al. (2015), 98.9% of preterm infants had vitamin D deficiency, with 50% having severe vitamin D deficiency (less than 10 ng/ml) [28]. In this study, the average serum vitamin D levels were doubled in infants up to 32 weeks compared to the infants less than 32 weeks. In a study conducted by Singh et al. (2016), vitamin D levels in preterm infants were lower than those in full-term infants. Vitamin D deficiency was 94.74%, 87.78%, and 82.67% in the infants below 32 weeks, 32 to 37 weeks, and over 37 weeks, respectively [32]. A significant difference was observed in vitamin D levels at different gestational ages ($p < 0.001$), with higher prevalence of severe and moderate vitamin D deficiency at lower gestational ages. On the other hand, infants with gestational ages over 32 weeks had higher levels of vitamin D (18.05±11.64 ng/ml) compared to those with gestational ages below 32 weeks (10.97±6.31) [8].

Infants' vitamin D status at birth depends on the mothers' vitamin D status during pregnancy. The results of a study showed that the low level of 25-hydroxy vitamin D in mother are associated with increased risk of tooth decay in infancy [30]. A study conducted by Choi et al. demonstrated that majority of Korean pregnant women suffer from vitamin D deficiency, which can play an effective role in reducing vitamin D levels in preterm infants [10]. Cetinkaya et al. (2015) showed that vitamin D levels were lower in newborns of mothers with vitamin D deficiency [9]. Therefore, vitamin D supplementation during

**Table 2. Comparison of some neonatal variables in both control and case groups**

| Variable / Group | Infants in the contol group 45 (51.7) infants | Infants in the case group 42 (48.3) infants | Level of significance* (Statistical test (2)) |
|---|---|---|---|
| **Blood culture (first day)** | | | |
| - positive | 0 (0) | 13 (32.5) | 0.000 |
| - negative | 42 (100) | 27 (67.5) | |
| **Second blood culture** | | | |
| - positive (after 3 first days) | 0 (0) | 19 (65.52) | 0.000 |
| - negative | 33 (100) | 10 (34.48) | |
| **Cerebrospinal fluid culture** | | | |
| - positive | 0 (0) | 10 (35.71) | 0.081 |
| - negative | 6(100) | 18 (64.29) | |
| **Brain sonography** | | | |
| - normal | 43 (100) | 30 (83.33) | 0.021 |
| - IVH1 | 0(0) | 5 (13.89) | |
| - IVH2 | 0(0) | 1 (2.78) | |

**Note.** $p < 0.05$ was considered statistically significant.

**Table 3. Mean serum vitamin D levels in the types of infant infections**

| Infection status | Serum vitamin D levels Mean±SD |
|---|---|
| Lack of infection (normal) | 23.31±9.40 |
| Sepsis | 12.21±9.27 |
| Meningitis | 21.30±14.06 |
| Clinical Infection | 5.30±1.65 |
| Meningitis + sepsis | 7.10±2.15 |
| Cytologic meningitis | 8.75±3.92 |

pregnancy improves 25-hydroxy vitamin D levels and can prevent maternal and neonatal complications [9].

Ninety-five percent of our infected infants exhibited low vitamin D levels and 62% of them suffered from severe vitamin D deficiency. In the study of Workneh et al. (2020), Low levels of vitamin D in the cord and maternal blood were significantly associated with neonatal sepsis. Therefore, vitamin D supplementation for pregnant newborns and women could decrease neonatal sepsis [35].

In a study performed by Kanth et al. (2016), 36% of infants in the case group (with early sepsis) and 13% of cases in the control group (without clinical and laboratory evidences of infection) had severe vitamin D deficiency (less than or equal to 12 ng/ml) [18]. In the study of Rech et al. (2014), the incidence of sepsis was significantly higher in cases of vitamin D deficiency (37.3%) than in inadequate (28.6%) or adequate (22.1%) vitamin D levels [29]. In the study of Delrue et al. (2023), the vitamin D status was investigated in prenatal sepsis. In the sepsis group's maternal and neonatal 25(OH) D concentrations were noticeably lower than those of the non-sepsis group ($p < 0.001$ [12]. The sepsis group had a significantly higher percentage of severe vitamin D deficiency than the non-sepsis group.

As the problems of infants with sepsis increase, the mechanism of vitamin D deficiency may be due to the immunological effects of vitamin D; however, the mechanism of vitamin D is complex in immune system [1]. According to a study, there was a significant relationship between vitamin D deficiency in mothers and infants and prolonged rupture of the membranes, with the likelihood of PROM rising as the neonatal sepsis increased [1].

The important role of vitamin D as a regulator of calcium and bone metabolism is well-known; however, vitamin D plays a role in regulating the innate immune system through the production of antimicrobial peptides in epithelial cells, neutrophils, and macrophages [11, 16]. Vitamin D plays a crucial role in prevention sepsis and neonatal diseases [9] as its function is present in almost all types of immune cells, and the response to pathogens by vitamin D receptors [4]. Thc expression of vitamin D receptors in some immune cells is controlled by safety signals. The increase in the number of vitamin D receptors in the immune system and their regulating by safety

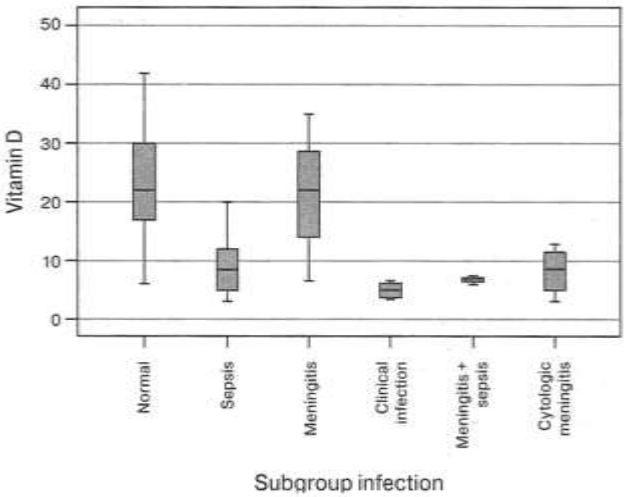


**Figure. Relationship between infection and vitamin D level**

signals highlight an important role for this hormone as a regulator of immune responses [4]. In addition to influencing hormonal response to sepsis, vitamin D can play a role in the local response of tissue to infection [26]. 1,25-hydroxy vitamin D3 as the active form of vitamin D, regulates the immune system and targets immune cells such as monocytes, macrophages, dendritic cells, and T and B lymphocytes, thereby regulating both innate and adaptive immune responses. Furthermore, immune cells produce the enzymes that activating vitamin D, allowing local conversion of inactive vitamin D to 1,25-hydroxy vitamin D3 in the immune system [4]. Vitamin D can reduce the risk of sepsis by increasing LL-37 Cathelicidin levels, which acts an endogenous antimicrobial peptide and plays a defensive role against a wide variety of infectious factors such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and micro-bacteria [22, 23]. LL-37 is known as the only member of the Cathelicidin family of host defense peptides in humans so that it is primarily produced by leukocytes and epithelial cells. It regulates a wide range of biological responses, including direct killing of microorganisms, chemotaxis and chemokine induction, regulation of inflammatory responses, angiogenesis, and wound healing [27].

In our study, 95% of infected infants had vitamin D levels less than 30 ng/ml, while in the control group, 71% of cases had vitamin D deficiency ($p = 0.003$). Aydemir et al. (2014) conducted a study on children with sepsis, and the cutoff point of 20 ng/ml for vitamin D Hydroxy exhibited a sensitivity and a specificity of 84% and 76% for diagnosing sepsis as compared with controls [3]. Therefore, serum levels of vitamin D can be utilized as a diagnostic marker with high sensitivity, but low specificity or the diagnosis of infection.

Vitamin D levels in infants with early sepsis is approximately 4 ng/ml lower than those in late-onset sepsis. Although vitamin D plays a role in the incidence of respiratory tract infections in children

and adults, its role in the prevention of neonatal sepsis is still not entirely clear. In their study, Cetinkaya et al. (2015) investigated 25-hydroxy vitamin D levels in healthy infants and infants with early sepsis, and the results showed that lower levels of vitamin D are associated with early sepsis, and severe vitamin D deficiency is very common in the infants with sepsis [9]. In a study conducted by Alves et al. (2015), severe vitamin D deficiency (less than 10 ng/ml) was obsrved in 69.2% of patients with sepsis and 48% of patients without sepsis [2]. Ginde et al. (2011) evaluated the relationship between the concentration of vitamin D and severity of sepsis and found that serum vitamin D levels in patients with severe sepsis were lower than those in the patients with sepsis without organ dysfunction [14]. The results of a prospective study conducted by Uday Kanth et al. (2016) demonstrated that 25-hydroxy vitamin D levels in infants with early sepsis were significantly lower than those in healthy infants, and about 36% of infants with early sepsis exhibited 25-hydroxy vitamin D levels less than or equal to 12 ng/ml [18]. Innate and adaptive immune cells can express vitamin D receptors and respond to stimulations using 1,25-hydroxy vitamin D. Vitamin D-binding protein levels are decreased in the patients with sepsis, leading to exacerbating vitamin D deficiency [34].

The limitation of this study was the hospital control group which was unavoidable due to the significance of gestational age as an intervention factor.

## Conclusion

The results of the present study showed that 83% of preterm infants had vitamin D deficiency, of whom almost one-third of infants had severe vitamin D deficiency (less than 10 ng/ml). Also, the low serum levels of vitamin D were associated with an increased incidence of neonatal sepsis. Therefore, given the inverse relationship between serum vitamin D levels and the incidence of sepsis, the use of serum vitamin D level assay is useful as a valuable diagnostic marker with high sensitivity.

## Acknowledgement

This paper is obtained from a study approved by Mashhad University of Medical Sciences (code: 940795). Hereby, we express our deepest sense of gratitude and indebtedness to Deputy of Research and Technology, Research Manager and Other officials of Mashhad University of Medical Sciences and special thanks to everyone who helped and contributed to conducting this project.

## Conflicts of interest

None declared.

## Sources of funding

Mashhad University of Medical Sciences (code: 940795)

## References

1. Alouf B., Grigalonis M. Incidental finding of vitamin-D deficient rickets in an otherwise healthy infant — a reappraisal of current vitamin-D supplementation guidelines. *J. Nat. Med. Assoc., 2005, vol. 97, no. 8, pp. 1170–1173.*
2. Alves F.S., Freitas F.G.R., Bafi A.T., Azevedo L.C.P., Machadom F.R. Serum concentrations of vitamin D and organ dysfunction in patients with severe sepsis and septic shock. *Rev. Bras. Ter. Intensiva, 2015, vol. 27, no. 4, pp. 376–377.*
3. Aydemir G., Cekmez F., Kalkan G., Fidanci M.K., Kaya G., Karaoglu A., Meral C., Arzıman İ., Karademir F., Ayar G., Gunduz R.C., Suleymanoglu S. High serum 25-hydroxyvitamin D levels are associated with pediatric sepsis. *Tohoku J. Exp. Med., 2014, vol. 234, no. 4, pp. 295–298. doi: 10.1620/tjem.234.295*
4. Baeke F., Takiishi T., Korf H., Gysemans C., Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol., 2010, vol. 10, no. 4, pp. 482–496. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001*
5. Belderbos M.E., Houben M.L., Wilbrink B., Lentjes E., Bloemen E.M., Kimpen J.L., Rovers M., Bont L. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics, 2011, vol. 127, no. 6: e1513-20. doi: 10.1542/peds.2010-3054*
6. Boskabadi H., Moudi A., Parvini Z., Barati T. Evaluation of the cause and related factors of neonatal mortality in Qaem hospital 1388-89. *Iran. J. Obstet. Gynecol. Infertil., 2012, vol. 14, no. 7, pp. 21–26.*
7. Boskabadi H., Maamouri G., Tavakol Afshari J., Mafinejad S., Hosseini G., Mostafavi-Toroghi H., Saber H., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality. *Iran J. Basic. Med. Sci., 2013, vol. 16, no. 12, pp. 1232–1237.*
8. Cameron C., Dallaire F., Vézina C., Muckle G., Bruneau S., Ayotte P., Dewailly E. Neonatal vitamin A deficiency and its impact on acute respiratory infections among preschool Inuit children. *Can. J. Public Health, 2008, vol. 99, no. 2, pp. 102–106. doi: 10.1007/BF03405454*
9. Cetinkaya M., Cekmez F., Buyukkale G., Erener-Ercan T., Demir F., Tunc T., Aydın F.N., Aydemir G. Lower vitamin D levels are associated with increased risk of early-onset neonatal sepsis in term infants. *J. Perinatol., 2015, vol. 35, no. 1, pp. 39–45. doi: 10.1038/jp.2014.146*
10. Choi R., Kim S., Yoo H., Cho Y.Y., Kim S.W., Chung J.H., Oh S.Y., Lee S.Y. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant Korean women: the first trimester and the winter season as risk factors for vitamin D deficiency. *Nutrients., 2015, vol. 7, no. 5, pp. 3427–3248. doi: 10.3390/nu7053427*
11. Clancy N., Onwuneme C., Carroll A., McCarthy R., McKenna M.J., Murphy N., Molloy E.J. Vitamin D and neonatal immune function. *J. Matern. Fetal Neonatal Med., 2013, vol. 26, no. 7, pp. 639–646. doi: 10.3109/14767058.2012.746304*

12. Delrue C., Speeckaert R., Delanghe J.R., Speeckaert M.M. Vitamin D deficiency: an underestimated factor in sepsis? *Int. J. Mol. Sci., 2023, vol. 24, no. 3: 2924. doi: 10.3390/ijms24032924*
13. Elfarargy M.S., Elsharkawy H., Elgendy M., Nassar M., Attia G., Abu Elmaaty M. Study of lactate and nucleated red blood cells as early predictors of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Scientific Paediatrics, 2018, vol. 1, no. 2, pp. 3–8.*
14. Ginde A.A., Camargo C.A. Jr., Shapiro N.I. Vitamin D insufficiency and sepsis severity in emergency department patients with suspected infection. *Acad. Emerg. Med., 2011, vol. 18, no. 5, pp. 551–554. doi: 10.1111/j.1553-2712.2011.01047.x*
15. Gniadecki R., Gajkowska B., Hansen M. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates the assembly of adherens junctions in keratinocytes: involvement of protein kinase C. *Endocrinology. 1997, vol. 138, no. 6, pp. 2241–2248.*
16. Holick M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med., 2007, vol. 357, no. 3, pp. 266–281. doi: 10.1056/NEJMra070553*
17. Javadi-Nia S., Noorbakhsh S., Izadi A., Shokrollahi M.R., Asgarian R., Tabatabaei A. Vitamin A, D and zinc serum levels in children with and without acute respiratory tract infection in two university hospitals. *Tehran. University. Medical. Journal, 2014, vol. 71, no. 12, pp. 794–799.*
18. Kanth S., Reddy K., Abhishek G. Association between vitamin D levels and early onset sepsis in infants: a prospective observational study. *Int. J. Contemp. Pediatr., 2016, vol. 3, no. 4, pp. 1189–1192.*
19. Karatekin G., Kaya A., Salihoğlu O., Balci H., Nuhoğlu A. Association of subclinical vitamin D deficiency in newborns with acute lower respiratory infection and their mothers. *Eur. J. Clin. Nutr., 2009, vol. 63, no. 4, pp. 473–477. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602960*
20. Kempker J.A., Han J.E., Tangpricha V., Ziegler T.R., Martin G.S. Vitamin D and sepsis: an emerging relationship. *Dermatoendocrinol., 2012, vol. 4, no. 2, pp. 101–108. doi: 10.4161/derm.19859*
21. Leaf-nosed bat. Encyclopædia Britannica: Encyclopædia Britannica Online, 2009. *URL: https://www.britannica.com/animal/leaf-nosed-bat (07.08.2023)*
22. Lee C.J., Buznyk O., Kuffova L., Rajendran V., Forrester J.V., Phopase J., Islam M.M., Skog M., Ahlqvist J., Griffith M. Cathelicidin LL-37 and HSV-1 corneal infection: peptide versus gene therapy. *Transl Vis. Sci. Technol., 2014, vol. 3, no. 3: 4. doi: 10.1167/tvst.3.3.4*
23. Mookherjee N., Rehaume L.M., Hancock R.E. Cathelicidins and functional analogues as antisepsis molecules. *Expert Opin. Ther. Targets, 2007, vol. 11, no. 8, pp. 993–1004. doi: 10.1517/14728222.11.8.993*
24. Nair V., Soraisham A.S. Probiotics and prebiotics: role in prevention of nosocomial sepsis in preterm infants. *Int. J. Pediatr., 2013, vol. 2013: 874726. doi: 10.1155/2013/874726*
25. Najada A.S., Habashneh M.S., Khader M. The frequency of nutritional rickets among hospitalized infants and its relation to respiratory diseases. *J. Trop. Pediatr., 2004, vol. 50, no. 6, pp. 364–368. doi: 10.1093/tropej/50.6.364*
26. Nelson C.D., Reinhardt T.A., Beitz D.C., Lippolis J.D. In vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *PLoS One, 2010, vol. 5, no. 11: e15469. doi: 10.1371/journal.pone.0015469*
27. Nijnik A., Hancock R.E. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr. Opin. Hematol., 2009, vol. 16, no. 1, pp. 41–47. doi: 10.1097/moh.0b013e32831ac517*
28. Park S.H., Lee G.M., Moon J.E., Kim H.M. Severe vitamin D deficiency in preterm infants: maternal and neonatal clinical features. *Korean J. Pediatr., 2015, vol. 58, no. 11, pp. 427–433. doi: 10.3345/kjp.2015.58.11.427*
29. Rech M.A., Hunsaker T., Rodriguez J. Deficiency in 25-hydroxyvitamin D and 30-day mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Am. J. Crit. Care, 2014, vol. 23, no. 5, pp. e72–e79. doi: 10.4037/ajcc2014723*
30. Schroth R.J., Lavelle C., Tate R., Bruce S., Billings R.J., Moffatt M.E. Prenatal vitamin D and dental caries in infants. *Pediatrics, 2014, vol. 133, no. 5: e1277–e1284. doi: 10.1542/peds.2013-2215*
31. Shah S.S., Saleem M., Mehmood T., Ahmed T. Frequency and outcome of necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad., 2015, vol. 27, no. 1, pp. 85–87.*
32. Singh G., Singh G., Brar H., Malik S. Vitamin D levels in preterm and term neonates at birth. *Int. J. Contemp. Pediatr., 2016, vol. 4, no. 1, pp. 48–52.*
33. Sivanandan S., Soraisham A.S., Swarnam K. Choice and duration of antimicrobial therapy for neonatal sepsis and meningitis. *Int. J. Pediatr., 2011, vol. 2011: 712150. doi: 10.1155/2011/712150*
34. Watkins R.R., Yamshchikov A.V., Lemonovich T.L., Salata R.A. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *J. Infect., 2011, vol. 63, no. 5, pp. 321–326. doi: 10.1016/j.jinf.2011.07.002*
35. Workneh Bitew Z., Worku T., Alemu A. Effects of vitamin D on neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Food Sci. Nutr., 2020, vol. 9, no. 1, pp. 375–388. doi: 10.1002/fsn3.2003*

**Авторы:**
**Закерихамиди М.**, доктор философии (репродуктивное здоровье), доцент кафедры репродуктивного здоровья кафедры акушерства факультета медицинских наук филиала Тонекабон Исламского университета Азад, Тонекабон, Иран;
**Боскабади Х.**, профессор кафедры педиатрии, факультет медицины Мешхедского университета медицинских наук, г. Мешхед, Иран;
**Фарамарзи Р.**, доцент кафедры педиатрии, факультет медицины Мешхедского университета медицинских наук, г. Мешхед, Иран.

**Authors:**
**Zakerihamidi M.**, Associate Professor of Reproductive Health, Department of Midwifery, School of Medical Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran;
**Boskabadi H.**, Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;
**Faramarzi R.**, Assistant Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Поступила в редакцию 19.03.2023
Отправлена на доработку 20.04.2023
Принята к печати 23.06.2023

Received 19.03.2023
Revision received 20.04.2023
Accepted 23.06.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 761–766

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 761–766

# ASSESSING A RELATION BETWEEN COMPOSITION OF LUMINAL AND TISSUE MICROBIOTA AND CERVICAL INTRAEPITHELIAL CHANGES

**S.M. Chechko[a,b], A.V. Lyamin[a], A.V. Kazakova[a], A.V. Yanchenko[a], N.V. Sapozhkova[b], E.S. Katorkina[c], M.E. Stolbova[d]**

[a] *Samara State Medical University, Samara, Russian Federation*
[b] *Samara City Clinical Hospital No. 2 named after N.A. Semashko, Samara, Russian Federation*
[c] *Clinics of Samara State Medical University, Samara, Russian Federation*
[d] *Samara Regional Center "Dynasty", Samara, Russian Federation*

**Abstract.** The incidence of cervical cancer (CC) in Russia remains at a high level and ranks fourth among all cancers. CC is preceded by mild, moderate, and severe cervical intraepithelial neoplasia. Human papillomavirus (HPV) is known to be the main cause for its development being responsible for 99% cancer cases. Despite HPV infection, the oncological process occurs only under certain conditions. There are risk factors that indirectly affect the course and emergence of cervical dysplasia. In recent years, the role of cervico-vaginal microbiome for onset and progression of this pathology has been actively discussed. Many studies evidence that dysbiosis along with cervical intraepithelial dysplasia is associated with increased HPV viral load, additionally allowing to clarify a role of specific microorganisms. Despite the knowledge rapidly accumulating about the nature of vaginal microbiome in cervical precancerous processes, the level of its impact on disease course has not been fully investigated and is of great interest. Identification of microorganisms that affect emergence and progression of this pathology will allow to prevent and apply select approach to treatment of dysbiosis. The aim of our study was to identify a relation between cervical tissue and luminal culturome and severe cervical intraepithelial neoplasia. The study evaluated the microbiota of cervical and cervical canal mucosa biopsy in patients with cervical intraepithelial changes. According to the study results, the *Streptococcus* genus representatives were significantly more frequent in cervical biopsy specimens in severe dysplasia vs. no cervical intraepithelial changes, whereas cervical canal cultures provided comparable data. Bacteria from the *Corynebacterium* genus were found in cervical biopsy specimens 3 times more often than in smear from the cervical canal mucous membrane. The microbiota from cervical and cervical canal biopsy specimens differ qualitatively and quantitatively particularly regarding prevalence of *Streptococcus* spp. representatives being more common in patients with cervical dysplasia. *Corynebacterium* spp. were detected more often in cervical biopsy specimens than in cervical canal smears. Thus, the method of collecting biological material has a great influence on final results.

***Key words:*** *cervical intraepithelial neoplasia, cervical microbiome, biopsy specimen of the cervix, bacteriological examination, Streptococcus spp., Corynebacterium spp.*

**Адрес для переписки:**
Янченко Анна Витальевна
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 963 116-31-51.
E-mail: pystnica131902@gmail.com

**Contacts:**
Anna V. Yanchenko
443079, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89,
Samara State Medical University.
Phone: +7 963 116-31-51.
E-mail: pystnica131902@gmail.com

**Для цитирования:**
Чечко С.М., Лямин А.В., Казакова А.В., Янченко А.В., Сапожкова Н.В., Каторкина Е.С., Столбова М.Е. Оценка связи состава просветной и тканевой микробиоты с интраэпителиальными изменениями шейки матки // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 761–766. doi: 10.15789/2220-7619-AAR-11258

**Citation:**
Chechko S.M., Lyamin A.V., Kazakova A.V., Yanchenko A.V., Sapozhkova N.V., Katorkina E.S., Stolbova M.E. Assessing a relation between composition of luminal and tissue microbiota and cervical intraepithelial changes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 761–766. doi: 10.15789/2220-7619-AAR-11258



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAR-11258

# ОЦЕНКА СВЯЗИ СОСТАВА ПРОСВЕТНОЙ И ТКАНЕВОЙ МИКРОБИОТЫ С ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ ШЕЙКИ МАТКИ

**Чечко С.М.[1, 2], Лямин А.В.[1], Казакова А.В.[1], Янченко А.В.[1], Сапожкова Н.В.[2], Каторкина Е.С.[3], Столбова М.Е.[4]**

[1] *ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Самара, Россия*
[2] *ГБУЗ СО Самарская городская клиническая больница № 2 имени Н.А. Семашко, г. Самара, Россия*
[3] *Клиники ФГБОУ ВО Самарского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Самара, Россия*
[4] *ГБУЗ Самарский областной медицинский центр «Династия», Самара, Россия*

**Резюме.** Заболеваемость раком шейки матки (РШМ) в России по-прежнему остается на высоком уровне и занимает четвертое место среди всех онкологических заболеваний. РШМ предшествует цервикальная интраэпителиальная неоплазия легкой, умеренной и тяжелой степени. Известно, что вирус папилломы человека (ВПЧ) служит основной причиной развития данной патологии и ответственен за 99% случаев развития рака. Несмотря на инфицирование ВПЧ онкологический процесс возникает только при наличии определенных условий. Существуют факторы риска, опосредованно влияющие на течение и возникновении дисплазии шейки матки. В последние годы активно обсуждается роль цервико-вагинального микробиома в возникновении и прогрессировании данной патологии. Многие исследования свидетельствуют о том, что дисбиоз, при наличии цервикальной интраэпителиальной дисплазии связан с повышенной вирусной нагрузкой ВПЧ, также уточняется роль конкретных микроорганизмов. Несмотря на быстро накапливающиеся знания о характере вагинального микробиома, при наличии предраковых процессов шейки матки, уровень его влияния на течение заболевания до конца не изучен и представляет большой интерес. Выявление микроорганизмов влияющих на возникновение и прогрессирование данной патологии позволит профилактировать и избирательно подходить к лечению дисбиоза. Целью нашего исследования было выявить связь между тканевым и просветным культуромом шейки матки и цервикальной интраэпителиальной неоплазией тяжелой степени. В исследовании оценивалась микробиота биоптата шейки матки и слизистой оболочки цервикального канала у пациентов с цервикальными интраэпителиальными изменениями. Согласно результатам исследования представители рода *Streptococcus* достоверно чаще встречались в биоптате шейки матки у пациенток с дисплазией тяжелой степени по сравнению с женщинами без интраэпителиальных изменений шейки матки, тогда как в посеве из цервикального канала эти результаты были сопоставимы, а бактерии из рода *Corynebacterium* обнаруживалась в биоптате шейки матки в 3 раза чаще, чем в мазке со слизистой оболочки цервикального канала. Микробиота биоптата шейки матки и цервикального канала качественно и количественно отличаются, в частности встречаемость представителей *Streptococcus* spp. отмечается чаще у пациентов с наличием дисплазии шейки матки, а *Corynebacterium* spp. — в биоптате шейки матки по сравнению с мазком из цервикального канала. Таким образом большое влияние на результат имеет способ сбора материала.

***Ключевые слова:*** *цервикальная интраэпителиальная неоплазия, цервикальный микробиом, биоптат шейки матки, бактериологическое исследование, Streptococcus spp., Corynebacterium spp.*

Microbiota plays a key role in human physiology and maintenance of homeostasis. In recent years, knowledge about the microbiome has changed significantly [4]. It is known that the vaginal ecosystem is a metabolically and microbiologically complex environment. In most women, the vaginal microbiota is dominated by numerous varieties of *Lactobacillus* spp., which form the colonization resistance of the mucous membranes. Thus, the loss of dominance of *Lactobacillus* spp. promotes colonization by anaerobic bacteria and an increase in microbial diversity, which in some cases contributes to the progression of cervical intraepithelial neoplasia. The development of cervical cancer is known to be associated with persistent human papillomavirus (HPV) infection [3]. Most often, HPV infection is transient [5], but long-term persistence of HPV is associated with an increased risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer [5]. Dysbiotic changes in the vaginal microflora are a risk factor for the persistence of HPV infection [2, 7]. Recent studies show a relationship between cervico-vaginal microflora and the progression of CIN. With the advent of modern methods for diagnosing the state of microbiome and rapidly accumulating knowledge in this area, many issues require further study and systematization.

The purpose of the study was to reveal the connection of tissue and luminal culture of the cervix with severe cervical intraepithelial neoplasia.

The study was conducted on the basis of Samara State Medical University. The study involved 29 women of reproductive age (from 18 to 45 years). All patients were divided into two groups. The main group included women with severe intraepithelial lesions (10 people). The comparison group included women with no intraepithelial changes in the cervix (19 people).

The exclusion criteria for both groups were: pregnancy, HIV infection, hepatitis B, C, patients who received antibiotics within 15 days prior to taking a sample or who had intercourse/douching within 48 hours prior to sampling.

To study the cervical microbiota in women of both groups, a microbiological examination of cultures of the mucous membrane of the cervical canal and biopsy specimen of the cervix was carried out. The method of seeding the biopsy specimen of the cervix was conducted according to the author's method (patent for invention No. 2784053). Collection of material from cervical canal of the cervix was carried out with a sterile swab, biopsy of the cervix with a gynecological conchotome with endovideo control (patent for utility model No. 213605). After collection, the samples were placed in liquid Amies transport medium and delivered to the laboratory within 2 hours under isothermal conditions. In the laboratory, the material was placed on an expanded set of solid nutrient media: 5% blood agar (HiMedia, India), anaerobic agar (HiMedia, India), veillonella isolation agar (HiMedia, India), clostridium isolation agar (HiMedia, India), bifidobacteria isolation agar (HiMedia, India), lactobacilli isolation agar (HiMedia, India), universal chromogenic medium (Bio-Rad, USA). The cultures were incubated for 5 days at 37°C under aerobic and anaerobic conditions. Then, using MALDI-ToF mass spectrometry (Microflex LT, Bruker), all isolated microorganisms were identified.

The present study evaluated the qualitative and quantitative composition of tissue and luminal microbiota in the smear from the cervical canal and biopsy specimen of the cervix, as well as the association of microbiota with cervical intraepithelial changes in the cervix.

Statistical analysis was carried out using the StatTech v. 2.8.7 (developer — Stattech LLC, Russia). Comparison of percentages in the analysis of the four-field contingency tables was performed using Pearson's chi-square test, Fisher's exact test. The link between the signs was regarded as statistically significant at a significance level of $p < 0.05$.

Representatives of the following genera of bacteria were isolated from the obtained material (Table 1).

As a result of evaluating the frequency of isolation of *Streptococcus* spp. bacteria, depending on the presence of intraepithelial changes in the cervix, statistically significant differences were found ($p = 0.017$). In the biopsy specimen of the cervix with intraepithelial changes, bacteria of the genus *Streptococcus* were found in 70% of cases, whereas in the biopsy specimen without dysplasia — in 21.1% of cases.

The presence of *Streptococcus* spp. in the biopsy specimens in patients of the main group was detected 8.750 times more often than in the control group, the differences in chances were statistically significant (95% CI: 1.528–50.112).

Then a study of *Streptococcus* spp. in a smear from the mucous membrane of the cervical canal was conducted. In patients with cervical dysplasia, bacteria of this genus were detected in 50% of cases, without dysplasia in 47.4% of cases, while there were no statistically significant differences between the groups.

A study of the species composition of *Streptococcus* spp. in a biopsy specimen and in a smear from the cervical canal was also carried out (Table 2).

The data obtained suggest that the presence of *Streptococcus* spp. is a marker associated with the presence of cervical dysplasia. The greatest number and variety of strains of *Streptococcus* spp. was found in a biopsy specimen of the cervix in patients with dysplasia. The most common was *S. anginosus*, which, along with *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, is part of the oropharyngeal microflora and these species cause oral pathology. The role of these microorganisms in the development of genital pathology is not fully understood. Their appearance in the vaginal microflora may be due to the prevalence of unprotected oral-genital contact. Thus, representatives of the genus *Streptococcus* are associated with the activation of many inflammatory cytokines and can affect the epithelial cells of the vagina and cervix, thereby contributing to the occurrence or progression of intraepithelial lesions of the cervix [6, 8, 12, 13, 14].

In comparing the qualitative characteristics of the microbiota of the biopsy specimen of the cervix and that of the cervical canal in the study groups, statistically significant differences were found for representatives of the genus *Corynebacterium* spp. These bacteria are able to adhere to vaginal cells and bind to extracellular matrix proteins such as fibronectin. When forming microbiocenosis in female reproductive tract, they affect the production of cytokines in the epithelial cells of the vagina. This allows them to compete with other microorganisms for adhesion sites and exist in the vaginal ecosystem both in health conditions and in various infectious diseases of the external and internal genital organs.

The data obtained by us indicate the ability of *Corynebacterium* spp. to invade, since they were significantly more common in the biopsy specimen of the cervix than in the smear from the cervical canal, which is an important result of the diagnostic search. However, there was no difference in the quantitative composition of *Corynebacterium* spp. in the biopsy specimen of the cervix of the main group (47.4%) and the comparison group (60%), as well as in the smear from the cervical canal — 15.8% and 20% respectively.

The species composition of *Corynebacterium* spp. is presented in Table 3.

The greatest variety of *Corynebacterium* spp. was found in the cervical canal of the cervix, which confirms the ability of this genus of bacteria to adhere. Colonizing the vaginal biotope, corynebacteria interact with various strains of microorganisms [1, 11]. Scientific publications show conflicting data about their role in the human body. *C. aurimucosum* causes urinary tract infection, *C. accolens* — pelvic osteomyelitis and granulomatous mastitis. In women with cervical cancer, *C. amycolatum* is found in the vaginal microbiome, but according to another study, this

**Table 1. Inter-group qualitative characteristics of cervical and cervical canal biopsy microbiota**

| The genus of microorganisms | Cervical biopsy specimen (number of patients) | | Cervical canal smear (number of patients) | | P |
|---|---|---|---|---|---|
| | Comparison group (n = 19) | Main group (n = 10) | Comparison group (n = 19) | Main group (n = 10) | |
| ***Staphylococcus* spp.** | 14 (73.7) | 8 (80.0) | 9 (47.4) | 8 (80.0) | 0.155 |
| ***Photobacterium* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 1 (10.0) | 0.473 |
| ***Escherichia* spp.** | 4 (21.1) | 1 (10.0) | 5 (26.3) | 1 (11.1) | 0.664 |
| ***Enterococcus* spp.** | 9 (47.4) | 3 (30.0) | 10 (55.6) | 5 (50.0) | 0.632 |
| ***Rothia* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 1 (10.0) | 0.473 |
| ***Haemophilus* spp.** | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.554 |
| ***Klebsiella* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 2 (10.5) | 0 (0.0) | 0.236 |
| ***Morganella* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 1 (5.3) | 1 (10.0) | 0.575 |
| ***Candida* spp.** | 2 (10.5) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0.532 |
| ***Enterobacter* spp.** | 1 (5.3) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.473 |
| ***Microbacterium* spp.** | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.554 |
| ***Stenotrophomonas* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.180 |
| ***Brevibacterium* spp.** | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0.779 |
| ***Gardnerella* spp.** | 5 (26.3) | 1 (10.0) | 4 (21.1) | 3 (30.0) | 0.705 |
| ***Cutibacterium* spp.** | 2 (10.5) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0.367 |
| ***Actinomyces* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 1 (5.3) | 1 (10.0) | 0.575 |
| ***Campylobacter* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.180 |
| ***Fusobacterium* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.180 |
| ***Peptostreptococcus* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.180 |
| ***Kocuria* spp.** | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0.779 |
| ***Aerococcus* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0.554 |
| ***Peptoniphilus* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.188 |
| ***Bifidobacterium* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0.180 |
| ***Acinetobacter* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0.554 |
| ***Dermabacter* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0.180 |
| ***Metamycoplasma* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0.180 |
| ***Dialister* spp.** | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0.180 |
| ***Alloscardovia* spp.** | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0 (0.0) | 1 (10.0) | 0.268 |
| ***Citrobacter* spp.** | 1 (5.3) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.554 |
| ***Micrococcus* spp.** | 2 (10.5) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.236 |
| ***Streptococcus* spp.** | 4 (21.1) | 7 (70.0) | 9 (47.4) | 5 (50.0) | 0.017* |
| ***Corynebacterium* spp.** | 9 (47.4) | 6 (60.0) | 3 (15.8) | 2 (20.0) | 0.043* |

**Note.** *Significant differences ($p < 0.05$).

**Table 2. Inter-group *Streptococcus* spp. species composition**

| Species of *Streptococcus* spp. | Biopsy specimen of the cervix (number of patients) | | Smear from the cervical canal (number of patients) | |
|---|---|---|---|---|
| | Comparison group (n = 19) | Main group (n = 10) | Comparison group (n = 19) | Main group (n = 10) |
| ***Streptococcus vestibularis*** | – | – | 1 | – |
| ***Streptococcus oralis*** | 1 | 2 | 1 | – |
| ***Streptococcus anginosus*** | 2 | 7 | 4 | 2 |
| ***Streptococcus mitis*** | – | 1 | – | – |
| ***Streptococcus sanguinis*** | – | 1 | – | – |
| ***Streptococcus pseudopneumonia*** | – | – | – | 1 |
| ***Streptococcus galloliticus*** | – | – | – | – |
| ***Streptococcus agalactiae*** | – | 1 | 2 | 1 |

**Table 3. Inter-group *Corynebacterium* spp. species composition**

| Species of *Corynebacterium* spp. | Biopsy specimen of the cervix (number of patients) | | Smear from the cervical canal (number of patients) | |
|---|---|---|---|---|
| | Comparison group (n =19) | Main group (n = 10) | Comparison group (n =19) | Main group (n = 10) |
| *Corynebacterium aurumucosum* | 1 | 1 | 1 | 2 |
| *Corynebacterium amylocatum* | 5 | 3 | 4 | 2 |
| *Corynebacterium tuberculostearicum* | 1 | 2 | 2 | 2 |
| *Corynebacterium simulans* | – | – | 1 | 1 |
| *Corynebacterium pyruviciproducens* | – | – | 1 | – |
| *Corynebacterium mucifaciens* | – | 1 | – | – |
| *Corynebacterium coyleae* | – | 1 | 1 | 1 |
| *Corynebacterium riegelii* | – | – | 1 | – |
| *Corynebacterium accolens* | – | – | – | 1 |

strain is considered as a probiotic, so the role of the *Corynebacterium* genus in the vaginal microbiome is not fully understood [1, 4, 9].

No connection between the remaining identified microorganisms and intraepithelial changes in the cervix was found.

In our study, we have identified an association between the presence of *Streptococcus* spp. in the biopsy specimen of the cervix and the presence of dysplasia. These results are consistent with the previous studies that have shown a correlation between impaired cervical microbiota and the development of cervical dysplasia [5, 14].

However, we found no statistically significant differences in the presence of *Streptococcus* spp. in a smear from the cervical canal in patients of both groups, which may indicate the ability of *Streptococcus* to adhere to the mucous membrane with further invasion. The conducted study clearly demonstrates the decisive importance of the method of collecting material. The resulting microflora qualitatively and quantitatively differs in the biopsy specimen of the cervix and the smear from the cervical canal. The data obtained confirm the need for further research in this area.

## References


1. Гладышева И.В., Черкасов С.В. Коринебактерии вагинального микробиома — потенциальные патогены или перспективные пробиотики? // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. № 3. 20 с. [Gladisheva I.V., Cherkasov S.V. Corinebacteria of vaginal microbiom — potential pathogens or perspective probiotics? *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Federal Research Center UB RAS, 2019, no. 3, 20 p. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2304-9081-2019-13022*
2. Clarke M.A., Rodriguez A.C., Gage J.C., Herrero R., Hildesheim A., Wacholder S., Burk R., Schiffman M. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis., 2012, vol. 12: 33. doi: 10.1186/1471-2334-12-33*
3. Cogliano V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F. WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol., 2005, vol. 6, no. 4: 204. doi: 10.1016/s1470-2045(05)70086-3*
4. Gladysheva I.V., Khlopko Y.A., Cherkasov S.V., Kataev V.Y. Genome sequence of Corynebacterium amycolatum ICIS 99 isolated from human vagina reveals safety and beneficial properties. *Arch. Microbiol., 2022, vol. 204, no 4: 226. doi: 10.1007/s00203-022-02852-7*
5. Ho G.Y., Bierman R., Beardsley L., Chang C.J., Burk R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med., 1998, vol. 338, no. 7, pp. 423–428. doi: 10.1056/NEJM199802123380703*
6. Kang G.U., Jung D.R., Lee Y.H., Jeon S.Y., Han H.S., Chong G.O., Shin J.H. Potential association between vaginal microbiota and cervical carcinogenesis in korean women: a cohort study. *Microorganisms, 2021, vol. 9, no. 2: 294. doi: 10.3390/microorganisms9020294*
7. Linhares I.M., Summers P.R., Larsen B., Giraldo P.C., Witkin S.S. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol., 2011, vol. 204, no. 2: 120.e1–5. doi: 10.1016/j.ajog.2010.07.010*
8. Liu J., Luo M., Zhang Y., Cao G., Wang S. Association of high-risk human papillomavirus infection duration and cervical lesions with vaginal microbiota composition. *Ann. Transl. Med., 2020, vol. 8, no. 18: 1161. doi: 10.21037/atm-20-5832*
9. Manzanares-Leal G.L., Coronel-Martínez J.A., Rodríguez-Morales M., Rangel-Cuevas I., Bustamante-Montes L.P., Sandoval-Trujillo H., Ramírez-Durán N. Preliminary identification of the aerobic cervicovaginal microbiota in mexican women with cervical cancer as the first step towards metagenomic studies. *Front. Cell Infect. Microbiol., 2022, vol. 12: 838491. doi: 10.3389/fcimb.2022.838491*
10. Mendling W. Vaginal microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol., 2016, vol. 902, pp. 83–93. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4_6*
11. Smith S.B., Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J. Physiol., 2017, vol. 595, no. 2, pp. 451–463. doi: 10.1113/JP271694*

12. Tao Z., Zhang L., Zhang Q., Lv T., Chen R., Wang L., Huang Z., Hu L., Liao Q. The pathogenesis of Streptococcus anginosus in aerobic vaginitis. *Infect. Drug. Resist., 2019, vol. 12, pp. 3745–3754. doi: 10.2147/IDR.S227883*
13. Wu M., Gao J., Wu Y., Li Y., Chen Y., Zhao F., Li C., Ying C. Characterization of vaginal microbiota in Chinese women with cervical squamous intra-epithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer, 2020, vol. 30, no. 10, pp. 1500–1504. doi: 10.1136/ijgc-2020-001341*
14. Zhang C., Liu Y., Gao W., Pan Y., Gao Y., Shen J., Xiong H. The direct and indirect association of cervical microbiota with the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Med., 2018, vol. 7, no. 5, pp. 2172–2179. doi: 10.1002/cam4.1471*

**Авторы:**
**Чечко С.М.**, ассистент кафедры акушерства и гинекологии Института педиатрии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия; врач акушер-гинеколог отделения оперативной гинекологии ГБУЗ СО Самарская городская клиническая больница № 2 им. Н.А. Семашко, г. Самара, Россия;
**Лямин А.В.**, д.м.н., директор Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
**Казакова А.В.**, д.м.н., доцент, зав. кафедрой акушерства и гинекологии Института педиатрии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
**Янченко А.В.**, специалист Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
**Сапожкова Н.В.**, зав. отделением оперативной гинекологии ГБУЗ СО Самарская городская клиническая больница № 2 им. Н.А. Семашко, г. Самара, Россия;
**Каторкина Е.С.**, зав. отделением гинекологии Клиник ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
**Столбова М.Е.**, врач акушер-гинеколог ГБУЗ Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия.

**Authors:**
**Chechko S.M.**, Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Pediatrics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation; Obstetrician-Gynecologist, Department of Operative Gynecology, Samara City Clinical Hospital No. 2 named after N.A. Semashko, Samara, Russian Federation;
**Lyamin A.V.**, DSc (Medicine), Director of Research and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;
**Kazakova A.V.**, DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Pediatrics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;
**Yanchenko A.V.**, Specialist of Research and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;
**Sapozhkova N.V.**, Head of the Department of Operative Gynecology, Samara City Clinical Hospital No. 2 named after N.A. Semashko, Samara, Russian Federation;
**Katorkina E.S.**, Head of the Department of Gynecology, Clinics of Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;
**Stolbova M.E.**, Obstetrician-Gynecologist, Samara Regional Medical Center «Dynasty», Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.05.2023
Принята к печати 28.08.2023

Received 20.05.2023
Accepted 28.08.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 767–777

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 767–777

# СТРАНИЦЫ ОБЩЕЙ ИСТОРИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ШКОЛ КАЗАНИ И САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

**Г.Ш. Исаева[1,2], В.Б. Сбойчаков[3], Б.Ю. Гумилевский[3]**

[1] *ФБУН Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Казань, Россия*
[3] *ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Статья подготовлена к 100-летнему юбилею кафедры микробиологии Военно-медицинской академии и 100-летию со дня присвоения имени Пастера Санкт-Петербургскому научно-исследовательскому институту эпидемиологии и микробиологии. В статье описан период становления микробиологических школ Казани и Санкт-Петербурга в конце XIX – начале XX в., развития в 20–30-е гг. и во время Великой Отечественной войны. Статья посвящена истории взаимодействия и сотрудничества между двумя школами, что послужило импульсом для их дальнейшего формирования. В ней представлены исторические вехи развития кафедр микробиологии Казанского государственного медицинского университета, Военно-медицинской академии, научных подразделений Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии и Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, освещены аспекты формирования новых научных направлений, даны краткие биографические данные сотрудников кафедры микробиологии, деятельность которых была связана с работой в данных учреждениях. Представлены биографические сведения, личностные характеристики, основные направления научно-практической деятельности известных ученых микробиологов, работавших в разные периоды своей жизни в Петербурге (Ленинграде) и Казани (В.М. Аристовский, Р.Р. Гельтцер, П.Н. Кашкин, И.И. Пряхин, А.Р. Конова, А.Г. Григорьева-Беренштейн). Подробно освещены вопросы вклада совместных исследований ленинградских и казанских ученых в разработку и совершенствование методов промышленного производства антибиотиков, лечебно-профилактических сывороток, бактериофагов в период Великой Отечественной войны. Статья подготовлена с использованием первоисточников: публикаций, воспоминаний сотрудников кафедры микробиологии КГМУ, ВМА, КНИИЭМ, СПб НИИЭМ имени Пастера, документов из архивов отделов кадров, а также Национального архива Республики Татарстан, архивных материалов кафедр микробиологии КГМУ и ВМА. Описаны основные научные достижения представителей казанской и санкт-петербургской школы микробиологов, их научный вклад в развитие микробиологии. В заключении отмечается необходимость сохранения исторической памяти о вкладе российских ученых в развитие микробиологии.

***Ключевые слова:*** *история медицины, медицинская микробиология, В.М. Аристовский, казанская школа микробиологии, санкт-петербургская (ленинградская) школа микробиологии.*

**Адрес для переписки:**
Исаева Гузель Шавхатовна
420015, Россия, г. Казань, ул. Большая Красная, 67,
ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (843) 236-67-21.
E-mail: guzelleisaeva@yandex.ru

**Contacts:**
Guzel S. Isaeva
420015, Russian Federation, Kazan, Bolshaya Krasnaya str., 67,
Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (843) 236-67-21.
E-mail: guzelleisaeva@yandex.ru

**Для цитирования:**
Исаева Г.Ш., Сбойчаков В.Б., Гумилевский Б.Ю. Страницы общей истории микробиологических школ Казани и Санкт-Петербурга // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 767–777. doi: 10.15789/2220-7619-POT-13777

**Citation:**
Isaeva G.S., Sboychakov V.B., Gumilevsky B.Yu. Pages of the common history of Kazan and Saint Petersburg microbiology schools // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 767–777. doi: 10.15789/2220-7619-POT-13777



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-POT-13777

# PAGES OF THE COMMON HISTORY OF KAZAN AND SAINT PETERSBURG MICROBIOLOGY SCHOOLS

**Isaeva G.S.[a,b], Sboychakov V.B.[c], Gumilevsky B.Yu.[c]**

[a] *Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russian Federation*
[b] *Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation*
[c] *S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** The paper is prepared for the 100th anniversary of the Department of Microbiology at the Military Medical Academy and the 100th anniversary of naming Louis Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology. The article is devoted to the history of interaction between Kazan and St. Petersburg (Leningrad) microbiological schools — from early XXth century to the present day. It provides historical milestones in developing Departments of Microbiology at the Kazan State Medical University and the Military Medical Academy as well as research departments both in the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology and the St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, highlights aspects of the joint establishment and development of the Kazan and St. Petersburg Microbiology Schools, provides brief biographical data of the microbiology department staff members, whose activities were related to work in such institutions. Biographical information, personal characteristics, major directions in scientific and practical activities of famous microbiologists who worked in various periods of own lives in St. Petersburg (Leningrad) and Kazan (V.M. Aristovsky, R.R. Geltzer, P.N. Kashkin, I.I. Pryakhin, A.R. Konova, A.G. Grigorieva-Berenstein) are presented. The efforts of Leningrad and Kazan scientists during the Great Patriotic War scientists to jointly develop and improve methods of industrial manufacture of antibiotics, therapeutic and prophylactic sera, bacteriophages are covered in detail. The article was prepared using primary sources: publications, memoirs of employees of the Department of Microbiology at the KSMU, VMA, KNIEM, St. Petersburg Pasteur Institute, documents from the archives of personnel departments, as well as the National Archive of the Republic of Tatarstan, archival materials of the Departments of Microbiology of KSMU and VMA. The main scientific achievements of representatives of the Kazan and St. Petersburg Microbiology Schools, their scientific contribution to development of microbiology field are described. Finally, it is noted about a need to preserve historical memory about the contribution of Russian scientists to development of microbiology field.

***Key words:*** *history of medicine, medical microbiology, V.M. Aristovsky, Kazan school of microbiology, St. Petersburg (Leningrad) school of microbiology.*

Медицинская микробиология сегодня — это динамично развивающаяся отрасль фундаментальной науки, которая открывает новые горизонты наших познаний микромира и дает исключительные возможности для создания новых технологий. Достижения молекулярной биологии и иммунологии позволили осуществить революционный прорыв в этой отрасли, благодаря чему стало возможно не только быстро обнаруживать неизвестные ранее патогены и оперативно реагировать на новые угрозы биологического происхождения, но и, вооружив человека инструментами для изменения генома и управления его функциями, редактировать геномы микроорганизмов, получать микроорганизмы с заданными свойствами, расшифровывать механизмы взаимодействия макроорганизма с микробиотой и разрабатывать меры по профилактике многих заболеваний. Но все эти достижения были бы невозможны без основательного фундамента, заложенного нашими предшественниками — великими микробиологами: И.И. Мечниковым, Г.Н. Габричевским, З.В. Ермольевой, А.А. Смородинцевым, А.А. Воробьевым и многими другими.

Становление ученого невозможно без участия в его судьбе наставника, учителя, школы. Поэтому обращение к нашей истории может помочь понять истоки наших достижений, осмыслить наши неудачи, чтобы двигаться дальше. Одним из поводов подготовки этой публикации стали юбилейные события в истории двух микробиологических школ — Казани и Санкт-Петербурга: в 2020 г. — 100-летие кафедры микробиологии имени академика В.М. Аристовского Казанского государственного медицинского университета и 120-летие Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, в 2023 г. — 100-летие кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова и 100-летие со дня присвоения имени Пастера Санкт-Петербургскому научно-исследовательскому институту эпидемиологии и микробиологии. В нашей публикации мы постараемся осветить основные вехи в развитии взаимодействия этих прославленных учреждений, отдать дань памяти людям, внесшим большой вклад в их развитие.

Конец XIX – начало XX в. ознаменовались становлением микробиологии как фундаментальной науки, в котором ведущее значение сыграли открытия гениального французского ученого Луи Пастера. Под руководством Пастера в созданном им институте работали сотрудники из разных стран, что стало пусковым механизмом для развития микробиоло-

гии. Среди любимых учеников Пастера был Илья Ильич Мечников, впоследствии ставший его заместителем. Лаборатория Мечникова была не только научным подразделением Пастеровского института, но и своеобразной кузницей кадров, куда съезжались молодые ученые со всей Европы для обучения и научных исследований. Вот как Поль де Крюи в книге «Охотники за микробами» поэтично описывает работу в этой лаборатории: «В этой лаборатории сто сердец бились как одно, и сто умов были одержимы одной и той же мыслью — создать славную эпическую поэму об этих... блуждающих клетках, которые, учуяв приближение смертельного врага, устремляются к нему... и, вступив с ним в бой, защищают нас от смерти» [1]. В этой книге среди многочисленных помощников И.И. Мечникова упоминается Иван Григорьевич Савченко (рис. 1).

Иван Григорьевич был командирован в Институт Пастера в 1895 г. После окончания научной стажировки он, вдохновленный новыми идеями, прибыл в конце 1896 г. в Казань. И.Г. Савченко вспоминал: «С Воспитанный в такой атмосфере Института Пастера, воспринявший еще от школы Минха и Подвысоцкого их отношение к науке, во всеоружии этой последней я прибыл в Казань. Я получил лабораторию, совершенно неприспособленную к научным работам, а также вновь построенный Бактериологический Институт. Оборудовать учреждение для работы было тогда легко: средства отпускались щедро и золотом. Через несколько месяцев из-за границы прибыло все, необходимое для работы, и я мог продолжать свои исследования в европейском научном масштабе» [10]. В Казанском Императорском университете ему было предложено заведование кафедрой общей патологии, где позднее, в 1903 г., он стал читать студентам курс лекций по бактериологии. На первых порах своей работы в Казани он обратился к изучению иммунитета при возвратном тифе. Эта работа позволила Ивану Григорьевичу наметить отправные точки, в последующем ставшие основой его оригинальных иммунологических идей, касающихся механизма и природы фагоцитарной защиты организма. Этот процесс он рассматривал в виде двухфазной реакции, каждая фаза которой протекает по законам физической химии, свойственным реакциям адсорбционного типа [3].

Также должны быть отмечены работы И.Г. Савченко, имеющие не только прикладное практическое значение, но и теоретическую ценность. Такой является его совместная с Д.К. Заболотным (1893) работа, связанная с героически произведенным ими на самих себе опытом иммунизации против холеры через рот. Ее принципиальное значение заключается в том, что она является одной из первых работ, показавших возможность пероральной иммунизации против кишечных инфекций.

В 1905 г. Иван Григорьевич, исходя из созданного им представления о патогенезе скарлатины, открыл специфический скарлатинозный токсин гемолитического стрептококка и изготовил в Казанском бактериологическом институте антитоксическую противоскарлатинозную лечебную сыворотку, которую он совместно с профессором В.К. Меньшиковым апробировал на больных педиатрической клиники университета. Много лет спустя в 1917 г. аналогичная сыворотка, изготовленная по тому же методу, была предложена для лечения скарлатины супругами Джордж и Глэдис Дик, причем американские авторы вынуждены были признать приоритет этого открытия за Иваном Григорьевичем [12].

Совершенно естественно, что, когда в Казани по инициативе профессора Николая Федоровича Высоцкого, был создан один из первых в России бактериологических институтов, И.Г. Савченко с самого его основания стал играть там главную роль. И.Г. Савченко воспитал плеяду выдающихся учеников, среди которых выделяется Вячеслав Михайлович Аристовский. Он начинал работу в лаборатории физиологической химии под руководством профессора А.А. Панормова после окончания медицинского факультета Казанского

**Рисунок 1. Иван Григорьевич Савченко**
Figure 1. Ivan Grigoryevich Savchenko


В. М. Аристовскій.

ВЛІЯНІЕ РЕАКЦІИ СРЕДЫ

НА СПЕЦИФИЧЕСКІЙ ЦИТОЛИЗЪ.

Экспериментальное изслѣдованіе.

КАЗАНЬ.

**Рисунок 2. Обложка диссертации В.М. Аристовского**

Figure 2. Cover of V.M. Aristovsky's dissertation

Императорского университета в 1908 г., но в 1909 г. перешел в Казанский бактериологический институт (бывшее название КНИИЭМ в начале XX в.), где получил фундаментальную иммунологическую и микробиологическую подготовку под руководством профессора И.Г. Савченко. В 1912 г. им была защищена докторская диссертация: «Влияние реакции среды на специфический цитолиз» [3] (рис. 2).

В 1916 г. Вячеслав Михайлович был призван на военную службу и назначен помощником заведующего Особой лаборатории по изготовлению противобубонночумных препаратов «ИЭМ» Кронштадтского флота («Чумной форт»). Здесь под руководством профессора Е.С. Лондона он принял участие в изготовлении противостолбнячной антитоксической сыворотки для действующей армии [8].

**Рисунок 3. Профессор В.М. Аристовский и аспирант З.Х. Каримова за работой (1931 г.)**

Figure 3. Professor V.M. Aristovsky and graduate student Z.H. Karimova at work (1931)

Революционные события 1917 г. внесли хаос в работу Казанского бактериологического института, многие его сотрудники навсегда покинули Казань. После освобождения Казани Красной армией в сентябре 1918 г. в институте оставались только два научных сотрудника — заместитель директора по хозяйственной части доктор П.Я. Майков, ведавший производством, и ассистент научного отделения В.М. Аристовский, к тому времени вернувшийся из Кронштадта, одновременно заведовавший лабораторией Казанского военного госпиталя. По решению медицинского факультета Казанского университета В.М. Аристовский был назначен новым директором института. В этот сложный период Казанский бактериологический институт тем не менее продолжал функционировать, о чем свидетельствуют сведения о выпускавшихся препаратах: 1919 г. — холерная вакцина, вакцина против крысиного тифа; 1922 г. — скарлатинозная вакцина; 1924 г. — стафилококковая и стрептококковая вакцины; 1927 г. — дифтерийный анатоксин; 1928 г. — холерно-тифозная дивакцина, противодизентерийная сыворотка, таблетированная дизентерийная вакцина [4, 12].

Вячеслав Михайлович Аристовский, находясь во главе института и кафедры микробиологии, созданной им в 1920 г. на медицинском факультете Казанского университета, смог проявить не только свои выдающиеся научные способности, но и организаторский талант. В.М. Аристовский обладал необходимой для руководителя интуицией, благодаря которой сумел собрать вокруг себя учеников-единомышленников, что позволило преодолеть кадровые проблемы (рис. 3).

Одним из талантливых учеников В.М. Аристовского был Рудольф Робертович Гельтцер. Окончив с отличием в 1914 г. Императорскую Военно-медицинскую академию, он поступил в качестве вольноопределяющегося в 92-й пехотный Печорский полк, квартировавший в Санкт-Петербурге. С началом Первой мировой войны Р.Р. Гельтцер получил назначение в действующую армию на Юго-Западный фронт на должность младшего врача. В июле 1918 г. Рудольф Гельтцер добровольно вступил в ряды Красной Армии и работал главным врачом подвижных госпиталей. По окончании военных действий был назначен врачом гарнизонной амбулатории в г. Казани. Приезд Рудольфа Робертовича в Казань был не случаен: его, больного сыпным тифом, привез с фронта в Казань В.М. Аристовский, что не только

спасло жизнь будущего ученого, но и определило его дальнейшую судьбу. Уже с октября 1921 г. под руководством В.М. Аристовского началась научно-педагогическая деятельность Р.Р. Гельтцера — сначала в должности ассистента кафедры микробиологии медицинского факультета Казанского университета, а с 1925 г. по совместительству — заведующим диагностическим отделением Казанского микробиологического института (название КНИИЭМ в 30-е гг. XX в.) [2].

В 1924–1926 гг. вышли совместные работы Гельтцера с профессором В.М. Аристовским, в которых описывались новые питательные среды для культивирования спирохет. Методика культивирования спирохет создавалась, прежде всего, для выделения возбудителей возвратного тифа. В дальнейшем на их основе была предложена питательная среда для культивирования бледной трепонемы, впоследствии получившая название «среда Аристовского–Гельтцера». После отъезда В.М. Аристовского в Ленинград в 1932 г. Рудольф Робертович Гельтцер стал заведовать кафедрой микробиологии в Казанском государственном медицинском институте и руководить научной деятельностью Казанского микробиологического института (рис. 4).

С 1932 г. В.М. Аристовский тесно связал свою судьбу с Ленинградом и Военно-медицинской академией имени С.М. Кирова, возглавив кафедру микробиологии, которой он руководил по 1948 г. До прихода В.М. Аристовского кафедра имела выраженную эпидемиологическую направленность. Именно Вячеслав Михайлович создал по-настоящему микробиологическую кафедру, способную выполнять практически все виды микробиологических исследований.

Продолжая исследования в области спирохетозов, Вячеслав Михайлович вел их на кафедре в трех направлениях: сифилис, возвратный тиф и лептоспироз. Интенсивное изучение лептоспироза было организовано из-за участившихся эпидемических вспышек этой болезни в различных районах страны. В.М. Аристовский совместно с Р.Р. Гельтцером разработал питательную среду для культивирования извитых бактерий, на которой в течение 7 лет поддерживалась чистая культура микроорганизмов. Это был самый длительный эксперимент подобного рода, который стал методической предпосылкой для широких экспериментальных исследований по изучению извитых бактерий. Данная среда состояла из нагретой кроличьей или человеческой сыворотки с прибавлением кусочка ткани мозга или яичка кролика. Однако на данной питательной среде невозможно было в полной мере увидеть и охарактеризовать колонии микроорганизмов. Поэтому дальнейшие усилия В.М. Аристовского были сосредоточены на создании плотной питательной среды, для которой требовались особые условия культивирования.

В академии Вячеслав Михайлович создает уникальный прибор для культивирования анаэробов, названный в последствии в его честь аппаратом Аристовского. В качестве химического поглотителя кислорода в данном аппарате используется смесь, состоящая из 1 мл 20% раствора пирогаллола и 1 мл насыщенного раствора карбоната натрия. Этот прибор мог использоваться не только для культивирования извитых бактерий, но и для обнаружения патогенных анаэробов — возбудителей столбняка и газовой гангрены. Работа над этой проблемой началась еще в 1936 г., однако по политическим мотивам половина сотрудников кафедры, принимавших участие в работе по этой проблеме, была арестована. Известному микробиологу удалось вновь вернуться к работе над прибором лишь к началу 1940 г. в связи с освобождением из заключения и возвращением к прежней работе части ранее уволенных сотрудников кафедры [7].

В ходе изучения этих трудов, опубликованных В.М. Аристовским и его сотрудниками в период 1933–1942 гг. в связи с решением научных задач по проблеме анаэробной инфекции, были установлены сроки не только опубликования, но и завершения работы над каждым из них. Например, первое сообщение В.М. Аристовского по поводу разработки им оригинального микроанаэростата, предназначавшегося для культивирования патогенных

**Рисунок 4. Коллектив кафедры микробиологии Казанского государственного медицинского института (1939 г.). В центре — зав. кафедрой профессор Р.Р. Гельтцер**

Figure 4. The staff of the Microbiology Department at the Kazan State Medical Institute (1939). Head of the Department, Professor R.R. Geltzer (in the center)

анаэробов, было сделано на одной из научных конференций, состоявшихся в 1937 г., когда был сконструирован опытный образец. Между тем, опубликование соответствующих сведений в открытой печати состоялось лишь в 1940 г. Окончание такой разработки означало переход от применения опытных образцов указанного аппарата к серийному его производству в промышленных масштабах.

Сопоставляя сроки указанных изменений в решении проблемы анаэробных инфекций на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии с периодами потерь сотрудников научной группы В.М. Аристовского по политическим мотивам, можно утверждать о зависимости между репрессиями, имевшими место в 1938 г., и отсутствием новых результатов, не достигнутых ими в течение двух последующих лет (1939–1940). Несмотря на многочисленные заслуги В.М. Аристовского в 1938–1939 гг. в течение 14 месяцев он находился в заключении, после чего был освобожден. Однако причины и обстоятельства ареста не были выяснены, что продолжало оставаться источником легенд об этом периоде жизни ученого. До этого он был арестован в 1931 г. по статье 58 и был реабилитирован только в феврале 1998 г. Научной группе В.М. Аристовского для разработки нового метода бактериологической диагностики

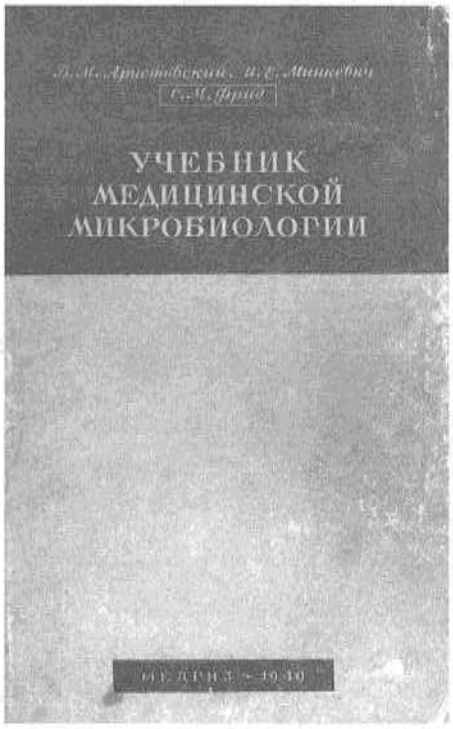


**Рисунок 5. Учебник «Медицинская микробиология» В.М. Аристовский, И.Е. Минкевич, С.М. Фрид. 1949 год**

Figure 5. V.M. Aristovsky, I.E. Minkevich, S.M. Frid. Medical microbiology. Textbook. 1949

возбудителей газовой гангрены потребовалось 9 лет (1933–1942). Вместе с тем этот период содержал длительный перерыв в научно-исследовательской деятельности указанной группы (1939–1940), связанный с репрессиями значительной части ее сотрудников.

Таким образом, новый метод бактериологической диагностики возбудителей газовой гангрены в соответствии с указанной концепцией мог быть разработан сотрудниками кафедры микробиологии в 1940 г., судя по фактическим затратам времени, потребовавшимся для решения нескольких научных задач, связанных с ним.

В Военно-медицинской академии авторским коллективом во главе с В.М. Аристовским написан и дважды издан фундаментальный учебник «Медицинская микробиология» (1945, 1949), который был долгое время лучшим учебным руководством для студентов медицинских вузов и практических микробиологов (рис.5).

6 августа 1938 г. начальнику кафедры микробиологии Военно-медицинской академии В.М. Аристовскому было присвоено звание бригадного врача, а уже в феврале 1943 г. — звание генерал-майора медицинской службы. Академик АМН СССР (1945). Заслуженный деятель науки РСФСР (1945), Консультант Главного военно-медицинского управления Ленинградского военного округа по вопросам предупреждения инфекционных заболеваний в войсках В.М. Аристовский ушел из жизни в 1950 г., похоронен на Богословском кладбище Санкт-Петербурга [13].

В.М. Аристовским создана крупнейшая советская школа микробиологов, иммунологов, спирохетологов. Среди его учеников были профессора М.И. Мастбаум, Б.Л. Мазур, Р.Р. Гельтцер, А.Ф. Агафонов, Г.Г. Кондратьев, З.Х. Каримова, И.А. Сироко.

Сын В.М. Аристовского — Олег Вячеславович Аристовский, полковник медицинской службы, стал военным врачом-инфекционистом, также связавшим свою жизнь с академией. В годы Великой Отечественной войны — начальник отделения эвакогоспиталя № 1767, помощник начальника госпиталя № 379 (4-й Украинский фронт). В период с 1957 по 1962 гг. был главным инфекционистом Группы советских войск в Германии.

Дочь В.М. Аристовского Татьяна Вячеславовна была известна как создатель научной школы микробиологов-почвоведов. Специалист в области исследований физиологических особенностей северных рас микроорганизмов и их отношения к условиям среды, применения бактериальных удобрений для повышения плодородия северных почв. Наряду с другими учеными она стала основателем почвенно-генетического направления в почвен-

ной микробиологии. Автор 117 научных работ, в том числе 2 монографий, лауреат премии им. Докучаева АН СССР (1970) за монографию «Микробиология подзолистых почв», вышедшую в 1965 г., и премии им. Вильямса ВАСХНИЛ (1982) за монографию «Микробиология процессов почвообразования» (1980). В 1990 г. Татьяна Вячеславовна вышла на пенсию и в связи с семейными обстоятельствами эмигрировала в Израиль. Похоронена в Иерусалиме. Ее младший сын Александр Самуилович Гребельский также стал микробиологом, живет в Иерусалиме.

Родной внук В.М. Аристовского член-корреспондент РАН профессор Борис Васильевич Громов, поддерживая семейные традиции, длительное время возглавлял кафедру микробиологии Ленинградского государственного университета. Б.В. Громов — выдающийся специалист в области цитологии и биологии бактерий и вирусов водорослей, лауреат Государственной премии СССР, Заслуженный деятель науки Российской Федерации. Ушел из жизни в 2001 г.

В 30-х гг. на кафедре микробиологии Казанского государственного медицинского института начал свою работу Иван Иванович Пряхин, ставший впоследствии старшим научным сотрудником кафедры микробиологии Военно-медицинской академии (рис. 6).

Выходец из крестьянской семьи, он в возрасте 25 лет поступил на медицинский факультет Казанского университета, совмещал учебу и работу санитарным инспектором, и уже во время учебы проявлял интерес к микробиологии. После окончания университета в ноябре 1934 г. был зачислен в аспирантуру на кафедру микробиологии Казанского медицинского института, после окончания которой в 1937 г. продолжил работу на той же кафедре в должности ассистента, одновременно являясь редактором газеты «Красный медик» [4, 6]. Осенью 1938 г. И.И. Пряхин был призван в кадры РККА и направлен из Казани на военную службу в Ленинград на должность младшего преподавателя кафедры микробиологии Военно-медицинской академии с присвоением воинского звания «военврач 3-го ранга». Во время советско-финляндской войны в 1939 г. был командирован в полевой подвижный военный госпиталь в качестве врача-бактериолога, где на практике в тяжелых фронтовых условиях проводил испытание микроанаэростата В.М. Аристовского. В ноябре 1941 г. И.И. Пряхин вместе с сотрудниками кафедры микробиологии Военно-медицинской академии был направлен в г. Самарканд Узбекской ССР, а в 1944 г. вернулся в Ленинград, получив назначение на должность начальника лаборатории при кафедре микробиологии. Продолжив научную деятельность, в 1946 г. И.И. Пряхин защитил кандидатскую диссертацию на тему «Экспериментальная оценка основных методов бактериологического анализа возбудителей газовой гангрены» [7].

В годы Великой Отечественной войны Казань была выбрана одним из главных эвакуационных центров, в результате чего в город были передислоцированы не только многие


**Рисунок 6. Иван Иванович Пряхин**
Figure 6. Ivan Ivanovich Pryakhin

**Рисунок 7. Коллектив кафедры микробиологии Казанского государственного медицинского института (1944 г.). В центре — зав. кафедрой профессор П.Н. Кашкин**
Figure 7. The staff of the Microbiology Department at the Kazan State Medical Institute (1944). Head of the Department, Professor P.N. Kashkin (in the center)

**Рисунок 8. Анна Романовна (Рувимовна) Конова**
Figure 8. Anna Romanovna (Ruvimovna) Konova

промышленные предприятия, но и научные учреждения страны. Уже в августе 1941 г. в Казань прибыли ведущие сотрудники Московского института им. Гамалеи, развернувшие работу на базе Казанского института эпидемиологии и микробиологии (КИЭМ — бывшее название КНИИЭМ). Вскоре к ним присоединилась и большая группа ленинградских ученых, в их числе был основоположник медицинской микологии профессор Петр Николаевич Кашкин. Он возглавил экспериментальную лабораторию КИЭМ, а с 1943 по 1945 гг. руководил кафедрой микробиологии КГМИ (рис. 7).

Такое научное пополнение, конечно, самым благотворным образом сказалось на деятельности обоих институтов. Исследования военных лет были посвящены изучению действия антибиотиков на патогенные микроорганизмы, при этом работа проводилась с грамицидином, мицетином, аспергиллином и пенициллином [3]. Доцент кафедры микробиологии Казанского медицинского института Е.К. Наумова в своей работе «Аспергиллин и его антибиотическое действие в условиях эксперимента и клиники» (1951 г.) так описывает этот период: «Запрос на лекарственные препараты особенно был велик в годы Великой Отечественной войны, когда было нужно использовать все средства для спасения раненых воинов, защищавших советское государство. По предложению профессора П.Н. Кашкина наша кафедра включилась в изучение антибиотиков» [8]. В 1945 г. впервые в СССР на базе КИЭМ при научном руководстве П.Н. Кашкина был развернут промышленный выпуск грамицидина. После возвращения в 1945 г. в Ленинград П.Н. Кашкин стал заведовать вновь организованным в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Пастера бактериологическим отделом, основным направлением деятельности которого стало изучение действия антибиотиков на различные микроорганизмы.

Также хотелось бы отметить вклад ученых-женщин в развитие Казанского института эпидемиологии и микробиологии, на чьи плечи легла большая ответственность за производство препаратов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний в годы Великой Отечественной войны. 1 сентября 1941 г. директором КИЭМ была назначена москвичка Полина Альбертовна Вершилова. С февраля 1943 до октября 1944 г. КИЭМ возглавляла ленинградка Анна Романовна (Рувимовна) Конова (рис. 8).

Из биографии Анны Романовны известно, что она родилась 5 июля 1900 г. в г. Ковно (г. Каунас, Латвия). В 1915 г. семья переехала в г. Бердянск в связи с выселением евреев из г. Ковно во время империалистической войны. После окончания гимназии в Бердянске в 1919 г. Анна Романовна училась сначала в Харьковском медицинском институте, а с 1922 г. — на медицинском факультете Первого Московского университета, который окончила в 1927 г. После окончания аспирантуры по бактериологии при Государственном Контрольном институте сывороток и вакцин им. Л.А. Тарасевича работала заведующей производственным сектором в Бактериологическом институте г. Ташкента. В феврале 1934 г. после возвращения в Ленинград начала работать во Всесоюзном Институте Экспериментальной медицины заведующей дифтерийным и дизентерийным отделениями. Защитила кандидатскую диссертацию в 1935 г., а 25 декабря 1936 г. приказом по Горздраву была назначена директором Института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, проработав в этой должности до 1939 г., а затем была переведена на научную работу в должности старшего научного сотрудника. После эвакуации в Казань с апреля 1942 г. Анна Романовна работала старшим научным сотрудником КИЭМ, а затем ассистентом гангренозной лаборатории. С 1 ноября 1942 г. при эпидемиологическом отделе КИЭМ была утверждена постоянно действующая спецлаборатория, заведующей которой была назначена А.Р. Конова. В феврале 1943 г. А.Р. Конова приступила к исполнению обязанностей директора КИЭМ, в октябре 1944 г. была освобождена от занимаемой должности в связи с переводом в г. Ленинград для постоянной работы в Институте имени Пастера [12].

В начале 1945 г. директором КИЭМ стала Антонина Михайловна Волкова (Борзунина). Под руководством этих самоотверженных женщин — П.А. Вершиловой, А.Р. Коновой, А.М. Волковой КИЭМ в годы войны смог не только увеличить производственные мощ-

ности и в несколько раз поднять производительность труда, но и нарастить выпуск уже освоенных ранее иммунобиологических препаратов. В КИЭМ были созданы новые производственные подразделения: гангренозная, столбнячная, сыпнотифозная лаборатории, экспериментальная лаборатория по выпуску антибиотиков, отдел обработки и концентрации сывороток. К началу Великой Отечественной войны институт выпускал продукцию семи наименований, 15 наименований экспериментальных серий, из которых шесть видов сывороток (нормальная, дифтерийная, скарлатинозная, менингококковая, стрептококковая, дизентерийная), пять видов вакцин (антирабическая, противотуберкулезная, дифтерийный и скарлатинозный анатоксины) и другие. За годы войны институтом был освоен выпуск новых препаратов: 1941 г. — четыре вида гангренозных сывороток, тривакцина; 1942 г. — противостолбнячная сыворотка; 1943 г. — противобрюшнотифозная вакцина, дизентерийный бактериофаг; 1944 г. — пентовакцина, сыпнотифозная вакцина; 1945 г. — грамицидин, агглютинирующие сыворотки [11].

Сотрудники эпидемиологического отдела КИЭМ в годы войны проводили огромную противоэпидемическую работу, принимали участие в ликвидации вспышек инфекционных заболеваний (скарлатины, дифтерии, сыпного тифа, оспы, дизентерии, холеры и др.). Семь сотрудников института, принимавших участие в ликвидации холеры, были награждены орденами за работу по борьбе с «инфекцией № 30». В число награжденных входила ленинградка Анна Григорьевна Григорьева-Беренштейн (рис. 9).

Анна (Эсфирь) Григорьевна (Гершевна) Григорьева-Беренштейн родилась 18 февраля 1902 г. в Кременчуге, ее родители занимались мелкой торговлей, владели галантерейным магазином. После окончания гимназии во время революционных событий 1917 г. Анна вступила в комсомол, в 1918 г. — в ряды Красной Армии и в течение двух лет работала секретарем райкома комсомола Баку. В 1924 г. после окончания гражданской войны она поступила в 1-й Московский Медицинский институт, а в 1925 г. переехала с семьей в Ленинград, где продолжила обучение в 1-м Ленинградском Медицинском институте, по окончании которого в 1931 г. получила диплом врача. Следующим шагом в профессиональной деятельности Анны Григорьевны стало поступление в аспирантуру в Институт вакцин и сывороток, окончив которую в 1933 г., продолжила работу в этом же институте. В 1937 г. была уволена «в связи со связями с врагами народа», но в том же году была восстановлена, и проработала в Институте вакцин и сывороток до 1939 г. Несмотря на такое «пятно» в биографии Анна Григорьевна в 1939 г.

**Рисунок 9. Анна (Эсфирь) Григорьевна (Гершевна) Григорьева-Беренштейн**
Figure 9. Anna (Esther) Grigorievna (Gershevna) Grigorieva-Berenstein

была назначена директором Института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, проработав на этом посту до 1942 г. Приказом по Ленгорздравотделу в 1941 г. на нее было возложено руководство лечебно-санитарным и противоэпидемическим обслуживанием эвакуированного из прифронтовой полосы населения Ленинграда. После гибели мужа на фронте в марте 1942 г. была командирована в КИЭМ, где работала до ноября 1944 г. [12]. В Казани она не только занималась противоэпидемической работой, но и проводила научные исследования под руководством заведующего кафедрой эпидемиологии Казанского медицинского института профессора А.Э. Озола [2]. После возвращения в Ленинград защитила кандидатскую диссертацию на тему «Эпидемиологические особенности дифтерии в военное время» и продолжила работать в Институте имени Пастера заведующей прививочным отделом.

Анализируя биографии наших ученых, чьи судьбы были связаны с двумя городами — Казанью и Санкт-Петербургом (Ленинградом) — В.М. Аристовского, Р.Р. Гельтцера, И.И. Пряхина, П.Н. Кашкина, А.Р. Коновой, А.Г. Григорьевой-Беренштейн и других, мы явственно видим общие главные черты того поколения, несмотря на то, что пути, которыми они шли через испытания революцией, гражданской войной, репрессиями, Великой Отечественной войной, были такими разными: это огромная жажда познания, целеустремленность, трудолюбие, вера в светлое будущее и беззаветное служение науке — микробиологии. Благодаря их достижениям наша страна смогла преодолеть все кризисы и выйти победителем. «Историческая память должна сохра-

няться, чтобы мы могли вовремя реагировать на возникающие угрозы для страны», — заявил президент РФ В.В. Путин на встрече 18 января 2023 г. с ветеранами Великой Отечественной войны и блокадниками Ленинграда и заверил, что для сохранения исторической памяти государство приложит все необходимые усилия [9]. Наша задача — помнить наших предшественников, учиться у них самоотверженному отношению к своему делу и постараться передать эти нити исторической памяти в руки наших учеников.

В настоящее время ситуация в мире характеризуется новыми вызовами и угрозами, что требует консолидации сил всего общества и микробиологического научного сообщества в том числе. Казанская и петербургская микробиологические школы с момента их основания развивались в постоянном тесном сотрудничестве, что в первую очередь достигалось на уровне личностных контактов, общности взглядов, взаимопроникновении идей. В настоящее время эти исторические связи не утрачены, они продолжают развиваться.

## Список литературы/References


1. Де Крюи П. Охотники за микробами. Москва: Наука, 1987. 419 с. [De Kruif P. Microbe hunters. *Moscow: Nauka, 1987. 419 p. (In Russ.)*]
2. Исаева Г.Ш. Альфред Эрнестович Озол — яркий пример беззаветного служения науке (к 130-летию со дня рождения) // Казанский медицинский журнал. 2022. Т. 103, № 4. С. 704–711. [Isaeva G.S. Alfred Ernestovich Ozol — a vivid example of selfless service to science (to the 130th anniversary of his birth). *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal, 2022, vol. 103, no. 4, pp. 704–711. (In Russ.)*] *doi: 10.17816/KMJ2022-704*
3. Исаева Г.Ш. Общие страницы славной истории // Казанский медицинский журнал. 2020. Т. 101, № 4. С. 622–630. [Isaeva G.Sh. The general page of the glorious history. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal, 2020, vol. 101, no. 4, pp. 622–630. (In Russ.)*] *doi: 10.17816/KMJ2020-622*
4. Исаева Г.Ш., Габидуллина С.Н. Казанская и петербургская (ленинградская) микробиологические школы: исторические параллели и пересечения // Материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня основания кафедры микробиологии. СПб., 2023. С. 79–88. [Isaeva G.Sh., Gabidullina S.N. Kazan and St. Petersburg (Leningrad) microbiological schools: historical parallels and intersections. Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the founding of the Department of Microbiology. *St. Petersburg, 2023. pp. 79–88. (In Russ.)*]
5. Исаева Г.Ш., Стремоухова М.В., Базиков И.А., Карташев И.В., Карташев А.В. Гордость Казанской школы микробиологов — профессор Рудольф Робертович Гельтцер и его ученики (к 130-летию со дня рождения) // Казанский медицинский журнал. 2020. Т. 101, № 3. С. 463–471. [Isaeva G.S., Stremoukhova M.V., Bazikov I.A., Kartashev I.V., Kartashev A.V. The pride of the Kazan school of microbiology is Professor Rudolf Robertovich Geltzer and his students (on the 130th anniversary). *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal, 2020, vol. 101, no. 3, pp. 463–471. (In Russ.)*] *doi: 10.17816/KMJ2020-463*
6. Личное дело «Пряхин Иван Иванович, ассистент кафедры микробиологии». Архив ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет». Архивный фонд Р-6446. Архивный номер 159. [Personal file "Pryakhin Ivan Ivanovich, assistant of the Department of Microbiology". Archive of the Kazan State Medical University. Archive fund R-6446. Archive number 159. *(In Russ.)*]
7. Минкевич И.Е. Очерк истории кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (к 150-летию ВМА). Ленинград, 1948. 289 с. [Minkevich I.E. An essay on the history of the Microbiology Department of the Kirov Military Medical Academy (to the 150th anniversary of the VMA). *Leningrad, 1948. 289 p. (In Russ.)*]
8. Наумова Е.К. Аспергиллин и его антибиотическое действие в условиях эксперимента и клиники //Труды санитарно-гигиенического факультета КГМИ. Казань, 1951. С. 129–142. [Naumova E.K. Aspergillin and its antibiotic action in the conditions of experiment and clinic. Proceedings of the sanitary and hygienic faculty of Kazan State Medical University. *Kazan, 1951, pp. 129–142. (In Russ.)*]
9. Путин призвал сохранять историческую память // РИА Новости. Дата публикации: 18.01.2023. [Putin urged to preserve historical memory. RIA Novosti. Date of publication: 18.01.2023. (In Russ.)] *URL: https://ria.ru/20230118/pamyat-1845725875.html*
10. Решетникова И.Д., Исаева Г.Ш., Габидуллина С.Н. Имя доброе живет: очерки и воспоминания о руководителях, учителях и коллегах, о периоде работы в Казанском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии. Савченко И.Г. Ответное слово юбиляра (произнесено 3 февраля 1929 года на торжественном заседании, посвященном 40-летней деятельности). Казань, 2021. С. 6–16. [Reshetnikova I.D., Isaeva G.Sh, Gabidullina S.N. The good name lives: essays and memoirs about leaders, teachers and colleagues, about the period of work at the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Savchenko I.G. The answer of the hero of the day (pronounced on February 3, 1929 at a solemn meeting dedicated to 40 years of activity. *Kazan, 2021, pp. 6–16. (In Russ.)*]
11. Решетникова И.Д., Исаева Г.Ш., Куликов С.Н., Габидуллина С.Н. О деятельности Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии в период Великой Отечественной войны (1941–1945) // Казанский медицинский журнал. 2020. Т. 101, № 5. С. 768–774. [Reshetnikova I.D., Isaeva G.S., Kulikov S.N., Gabidullina S.N. On the activities of the Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology during the Great Patriotic War of 1941–1945. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal, 2020, vol. 101, no. 5, pp.768–774. (In Russ.)*] *doi: 10.17816/KMJ2020-768*

12. Решетникова И.Д., Исаева Г.Ш., Савицкая Т.А., Баязитова Л.Т., Тюрин Ю.А., Халдеева Е.В., Агафонова Е.В., Куликов С.Н. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии — этапы большого пути // Казанский медицинский журнал. 2020. Т. 101. №6. С. 944–954. Reshetnikova I.D., Isaeva G.S., [Savitskaya T.A., Bajazitova L.T., Tyurin Y.A., Khaldeeva E.V., Agafonova E.V., Kulikov S.N. Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology — the stages of a long journey. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal, 2020, vol. 101, no.6, pp. 944–954. (In Russ.)*] *doi: 10.17816/KMJ2020-944*
13. Сбойчаков В.Б. В.М. Аристовский – выдающийся ученый первой половины XX века // Инновации в медицинской. фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии: сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. СПб.: Человек и его здоровье, 2017. С. 4–7. [Sboichakov V.B. V.M. Aristovskiy is a prominent scientist of the first half of the twentieth century. In: Innovations in Medicine, Pharmaceutical, Veterinary and Environmental Microbiology: Proceedings of the All-Russian Scientific And Practical Conference. *St. Petersburg: Chelovek i Ego Zdorov'e, 2017, pp. 4–7. (In Russ.)*]
14. Сбойчаков В.Б. Петербургский период в жизни и деятельности В.М. Аристовского. // Микробиология в современной медицине: сб. тезисов X Всерос. заочной науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 100-летию со дня образования государственной санитарно-эпидемиологической службы России. Казань: КГМУ, КНИИЭМ, 2022. С. 83–86. [Sboychakov V.B. The Petersburg period in the life and work of V.M. Aristovsky. Microbiology in modern medicine: a collection of abstracts of the X All-Russian Correspondence Scientific and Practical conference with international participation dedicated to the 100th anniversary of the establishment of the State Sanitary and Epidemiological Service of Russia. *Kazan: Kazan State Medical University, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 2022, pp. 83–86. (In Russ.)*]

**Авторы:**
**Исаева Г.Ш.**, д.м.н., доцент, зам. директора по инновационному развитию ФБУН Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; зав. кафедрой микробиологии им. В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Казань, Россия;
**Сбойчаков В.Б.**, д.м.н., профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;
**Гумилевский Б.Ю.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**
**Isaeva G.S.**, DSc (Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Innovation of Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation; Head of the Department of Microbiology named after V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation;
**Sboychakov V.B.**, DSc (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;
**Gumilevsky B.Yu.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.06.2023
Принята к печати 10.07.2023

Received 26.06.2023
Accepted 10.07.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 778–786

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 778–786

# УЧЕНИКИ ПАСТЕРА ИЗ РОССИИ — 2

**М.М. Карапац[1], Л.А. Краева[1,2]**

[1] *Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** В 2022 г. научная общественность всего мира отметила 200-летие выдающегося ученого, одного из основателей науки микробиологии — Луи Пастера. Труды Пастера способствовали становлению микробной теории и послужили основой развития профилактики инфекций, в том числе госпитальных. Среди учеников Пастера и его соратников, Э. Ру и И.И. Мечникова, было много российских ученых. Не все фамилии учеников Пастера известны широкому кругу читателей. Многое из них вернулись на Родину и внесли своим трудом существенный вклад в развитие микробиологии и иммунологии в России. В данной статье отражены результаты поиска биографий российских ученых — учеников Луи Пастера. Среди российских ученых, прошедших школу Пастеровского института, можно обнаружить многих выпускников одного из старейших медицинских учреждений России — Военно-медицинской академии. Это и соратник И.И. Мечникова и Н.Ф. Гамалеи — Я.Ю. Бардах, С.И. Златогоров, Н.И. Чистович, Л.А. Тарасевич; известные хирурги — В.А. Ратимов и В.А. Оппель, один из основателей института Пастера в Санкт-Петербурге — П.П. Маслаковец. Многие последователи Пастера принимали участие в создании в России (Санкт-Петербурге) института, подобного Пастеровскому в Париже — ныне это Институт экспериментальной медицины. Это Э.Ф. Шперк, В.И. Недригайлов и другие. Необходимо отметить и первую в России женщину — профессора бактериологии П.В. Циклинскую. Ученики Пастера получали от него теоретические и практические знания и возвращались на Родину, с тем чтобы с полной самоотдачей служить своему Отечеству. Они привозили с собой новые методы научных исследований и диагностики инфекционных заболеваний, применяли уже известные и разрабатывали собственные иммунные сыворотки и вакцинные препараты для борьбы с актуальными в те годы инфекциями: бешенство, чума, холера, брюшной тиф, туберкулез. Все российские ученые — ученики Луи Пастера и его друга и соратника И.И. Мечникова — продолжали дело служения обществу благодаря великим достижениям в области микробиологии. Свои знания и опыт они передавали многочисленным ученикам — продолжателям дела великого ученого Луи Пастера. Память о многих из них увековечена в названиях научно-исследовательских институтов, кафедр и лабораторий.

***Ключевые слова:*** *Луи Пастер, микробиология, иммунология, ученые из России, Военно-медицинская академия, вакцинопрофилактика.*

## DISCIPLES OF PASTEUR FROM RUSSIA — 2

**Karapats M.M.[a], Kraeva L.A.[a,b]**

[a] *S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** In 2022, a global scientific community noted the 200th anniversary of the outstanding scientist, one of founders of a science of microbiology — Louis Pasteur. Pasteur's works promoted formation of the microbic theory and gave a momentum to a search of ways for prevention of infections, including hospital ones. Among Pasteur's disciples and

**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:**
Карапац М.М., Краева Л.А. Ученики Пастера из России — 2 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 778–786. doi: 10.15789/2220-7619-DOP-9638

**Citation:**
Karapats M.M., Kraeva L.A. Disciples of Pasteur from Russia — 2 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 778–786. doi: 10.15789/2220-7619-DOP-9638



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DOP-9638

colleagues are E. Ru, I.I. Mechnikov as well as many Russian scientists. Not all family names of Pasteur's disciples were revealed to a wide range of readers. Much of them returned home and to bring a marked contribution to development of microbiology and immunology in Russia. Here, we continue seek out and return biographies of the Russian scientists — Louis Pasteur's disciples. Among Russian scientists who passed school of Pasteur Institute there may be mentioned many graduates of one of the oldest medical institutions of Russia — Military Medical academy as well as associates of I.I. Mechnikov and N.F. Gamalei — J.J. Bardach, S.I. Zlatogorov, N.I. Chistovich, L.A. Tarasevich; renowned surgeons — V.A. Ratimov and V.A. Oppel, one of founders of Pasteur Institute in St. Petersburg — P.P. Maslakovets. Many Pasteur's followers took part in creating the institute resembling Pasteur Institute nowadays known as the Institute of Experimental Medicine. In the latter regard, we mention E.F. Shperk, V.I. Nedrigajlov, etc. Moreover, it is also necessary to note the first woman in Russia Doctor P.V. Tsiklinskuju who was awarded a title Professor of Bacteriology. Pasteur's disciples received theoretical and practical knowledge from their teacher and returned to own Fatherlands to fully serve with full dedication. They brought with new methods of scientific research and diagnostics of infectious diseases, used already known immune serums and vaccine preparations and developed their own similar agents to combat infections that were relevant in those years: rabies, plague, cholera, typhoid fever, tuberculosis. All Russian scientists, disciples of Louis Pasteur as well as its friend and colleague I.I. Mechnikov continued to serve to a society owing to great achievements in the field of microbiology by transferring own knowledge and experience to numerous disciples — continuers of work of the great scientist Louis Pasteur. Many of them were immortalized in the names of research institutes, departments and laboratories.

***Key words:*** *Louis Pasteur, microbiology, immunology, scientists from Russia, Military Medical Academy, vaccinoprophylaxis.*

## Введение

27 декабря 2022 г. мировая научная общественность отметила 200-летие со дня рождения выдающегося французского ученого — Луи Пастера. Во Франции и на Мальте были выпущены монеты, посвященные этому юбилею, номиналом в 10 евро (рис. 1 и 2).

Журнал The Lancet (Ланцет, США) посвятил этому событию юбилейный номер. Поэтому мы сочли возможным дополнить существующую информацию о великом ученом в российской периодической печати [5].

Луи Пастер по праву считается основоположником микробиологии и иммунологии. Его работы оказали также большое влияние на развитие других отраслей медицины, в том числе и на профилактику госпитальных инфекций (сейчас «инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи», ИСМП). Его идеи вдохновили английского врача Дж. Листера, которого считают отцом асептики. Он писал Пастеру: «Позвольте мне поблагодарить Вас за то, что Вы своими блестящими исследованиями открыли мне глаза на существование гноеродных микроорганизмов и тем самым дали возможность успешного применения антисептического метода в медицинской хирургии».

Глубокие знания Пастера в области химии, микробиологии, иммунологии и других смежных дисциплинах, а также широкая известность ученого далеко за пределами Франции способствовали стажировке под его руководством специалистов различного профиля из разных стран мира, в том числе и из России. Здесь надо отметить, что из первых соратников Пастера медицинское образование (да и то незаконченное) имел лишь доктор Эмиль Ру.

Военно-медицинская (Медико-хирургическая) академия (ВМедА) была одним из немногих учреждений в России, которая оценила значимость открытий Пастера для медицины. Поэтому мы видим много ее воспитанников среди учеников великого француза. В свою очередь ВМедА избрала Луи Пастера Почетным членом академии (18.11.1892) [8].

**Рисунок 1. Памятная монета в честь 200-летия Луи Пастера (Франция, 10 евро)**

Figure 1. A commemorative coin in honor of the 200th anniversary of Louis Pasteur (France, 10 euros)


**Рисунок 2. Памятная монета в честь 200-летия Луи Пастера (Мальта, 10 евро)**

Figure 2. A commemorative coin in honor of the 200th anniversary of Louis Pasteur (Malta, 10 euros)

Дело Пастера продолжил другой выдающийся ученый, Нобелевский лауреат, работавший в институте Пастера в Париже — Илья Ильич Мечников. Поэтому здесь нам сложно определить: кто из отечественных медиков является учеником Луи Пастера, а кто — Ильи Мечникова. О двух из них (Н.Ф. Гамалее и Л.Л. Гейденрейхе) мы говорили в предыдущей статье [4].

Во время подготовки данной статьи наше внимание привлекла публикация писем профессора С.А. ИВАНОВА. Он окончил ветеринарное отделение Медико-хирургической академии в 1880 г. В 1886 г. был командирован московским губернским земством за границу: в Пастеровском институте занимался микробиологией и основами патологии.

В 1891–92 гг. С.А. Иванов во второй раз работал в Париже в лаборатории Дюкло по микробиологии молока и азотному обмену, слушал лекции И.И. Мечникова и Э. Ру. В письмах упоминаются и другие отечественные ученые, находившиеся в то время в Париже. Автор писем приводит много бытовых подробностей. В последующем С.А. Иванов работал профессором гигиены и зоотехники в ряде сельскохозяйственных институтов Киева (1893–1931) [2].

В начале 1886 г. Пастер начал прививать людей от бешенства, вся его лаборатория была занята приготовлением прививочного материала. Все другие вопросы были временно отложены. В то время в лаборатории Пастера трудились 40 исследователей и 15 врачей из России, а также специалисты из других стран. Упоминает С.А. Иванов и Н.Ф. Гамалею, с которым познакомился еще в Академии. Последний приглашал его в Одессу заняться чумой рогатого скота. Интересно его замечание о методе работы Пастера: «Это совершенно особый ум: научная фантазия, научное предчувствие, но только это не научный метод в немецком смысле этого слова. Его ассистенты работают над вопросами по плану, понятному для нас, а сам он действует по вдохновению».

Одновременно с С.А. Ивановым в Париже работал и П.Ф. ПЕТЕРМАН (1853–?), патолог, еще один выпускник Военно-медицинской академии, защитивший в 1889 г. диссертацию на тему: «О влиянии нарушенной деятельности кожи на общие явления в теле животного» в лаборатории экспериментальной патологии профессора В.В. Пашутина. П.Ф. Петерман возглавил антирабическую (Пастеровскую) станцию в Москве (в военном госпитале).

Если права на сибиреязвенную вакцину были проданы некоей фирме, что вынудило отечественных ученых создать свою вакцину (Ценковский), то успех и неудачи применения вакцины против бешенства привели к осознанию того факта, что необходимо создавать пастеровские станции во многих городах и странах. Луи Пастер, не чуждый саморекламы, направлял свой фотопортрет с дарственной надписью своим ученикам — руководителям первых антирабических станций во многих странах, в том числе П.Ф. Петерману. Когда в Военно-медицинской академии был объявлен конкурс на заведующего кафедрой инфекционных болезней с курсом бактериологии, П.Ф. Петерман был одним из кандидатов, наряду с Н.Ф. Гамалеей, Н.Я. Чистовичем, И.Ф. Рапчевским, Л.Л. Гейденрейхом и др. Однако на эту должность был избран С.С. Боткин.

РАТИМОВ Василий Александрович (1850–1904) — отечественный хирург, профессор. В 1876 г. окончил Петербургскую Военно-медицинскую академию и был оставлен в клинике госпитальной хирургии. В 1882 г. он защитил докторскую диссертацию «Опухоли верхней челюсти в клиническом отношении». Затем был командирован за границу на 2 года, работал в лаборатории Л. Пастера в Париже и Кронеккера (K.H. Kronecker) в Берне. В 1884 г. был избран заведующим кафедрой госпитальной хирургии в ВМедА, где проработал до конца жизни. В.А. Ратимов реорганизовал ее деятельность сообразно новым требованиям (асептика, антисептика); начал широко применять полостные операции. Наряду с клинической хирургией преподавал военно-полевую хирургию.

Он изучал этиологию, клинические проявления эхинококкоза печени и разрабатывал методы его оперативного лечения, описал множественный эхинококкоз брюшной полости. В.А. Ратимов создал крупную школу хирургов, представителями которой были П.Ф. Боровский, Р.Р. Вреден, В.А. Оппель, Л.М. Пуссеп, В.Н. Шевкуненко и другие. Он был председателем основанного в Петербурге в память о Н.И. Пирогове Общества русских врачей.

ЗЛАТОГОРОВ Семен Иванович (1873–1931) — советский микробиолог, эпидемиолог и инфекционист, член-корреспондент АН СССР (1929). После окончания Военно-медицинской академии (1897) работал на кафедре инфекционных болезней под руководством Н.Я. Чистовича. В 1900 г. защитил докторскую диссертацию на тему: «К вопросу о судьбе бактерий в организме животных, восприимчивых и невосприимчивых». С 1903 г. — приват-доцент ВМедА, а с 1911 г. — профессор бактериологии и инфекционных болезней Психоневрологического института в Петербурге (ныне Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова), с 1920 г. — профессор кафедры бактериологии и инфекционных болезней ВМедА и одновременно профессор кафе-

дры бактериологии Ленинградского женского медицинского института (ныне Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова). В 1924–1929 гг. С.И. Златогоров назначен директором Украинского санитарно-бактериологического института им. Мечникова в Харькове. С 1929 г. руководил Профилактическим институтом в ВМедА. Был организатором и участником экспедиций по борьбе с эпидемиями холеры и чумы в Астраханской губернии (1899), Персии (1904), Китае (1911).

С.И. Златогоров опубликовал около 150 научных работ. Основные из них посвящены биологии чумного микроба и холерного вибриона, этиологии скарлатины и сыпного тифа, изменчивости бактерий и иммунитету. Он изучал свойства ассоциированных вакцин и перспективы их использования. Разрабатывал вопросы этиологии и профилактики кори и скарлатины, предполагал, что существует фильтрующийся вирус, активирующий стрептококк. Определил продолжительность бациллоносительства при холере и чуме и выяснил, что холерный вибрион устойчив к воздействию низких температур и может длительное время сохраняться в иле рек, а чумная бацилла — в трупах животных. С.И. Златогоров является автором капитальных руководств по бактериологии «Учение о микроорганизмах», «Учение об инфекции и иммунитете», «Курс инфекционных болезней» [9].

ВЫСОКОВИЧ Владимир Константинович (1854–1912) — русский патологоанатом, эпидемиолог и бактериолог. В 1876 г. окончил медицинский факультет Харьковского университета, в 1882 г. защитил диссертацию на тему «О заболевании кровеносных сосудов при сифилисе». В 1884–1886 гг. проходил курсы усовершенствования в Германии, затем в течение 9 лет работал прозектором кафедры патологической анатомии Харьковского университета, одновременно читал курс общей патологической анатомии. В 1895 г. он был избран профессором кафедры патологической анатомии Киевского университета. В.К. Высоковичу принадлежит свыше 90 научных работ, посвященных различным вопросам патологической анатомии, физиологии, эпидемиологии и бактериологии. Совместно с И.И. Мечниковым он создал учение о ретикулоэндотелиальной системе, решающая роль в разработке которого ошибочно приписывалась немецким ученым. В.К. Высокович открыл способность эндотелиальных и фиксированных клеток соединительной ткани захватывать вводимые в кровь микробы; доказал, что судьба микробов во внутренних органах (печень, селезенка, костный мозг) зависит от степени патогенности возбудителя.

В 1897 г. В.К. Высокович возглавил русскую экспедицию, направленную в Индию для изучения эпидемии чумы и разработки эффективных мер борьбы с ней. Он участвовал в борьбе с эпидемией холеры в 1892 г., с эпидемиями чумы в Одессе в 1902 и 1910 гг., был организатором противоэпидемических мероприятий в русской армии во время русско-японской войны 1904–1905 гг. В 1894 г. он независимо от Вейксельбаума (A. Weichselbaum) доказал микробную этиологию цереброспинального менингита. В 1890 г. установил, что золотуха имеет туберкулезную этиологию.

НЕДРИГАЙЛОВ Виктор Иванович (08.11. 1865, Курск — 27.04.1923, Харьков), микробиолог, доктор медицины, профессор. Окончил Харьковский университет в 1893 г., после чего изучал бактериологию у В.К. Высоковича. Принял участие в организации (1894 г.) бактериологического института Харьковского медицинского общества. В 1896 г. работал в Париже у И.И. Мечникова. В 1909 г. защитил диссертацию посвященную резистентности гусениц пчелиной моли к различным микроорганизмам. С 1914 г. В.И. Недригайлов назначен заведующим сывороточным отделом Института экспериментальной медицины в Петербурге. С 1918 г. — член Петроградской вакцинно-сывороточной комиссии, руководимой Д.К. Заболотным и Н.Ф. Гамалеей. В.И. Недригайлову принадлежит 60 научных работ, относящихся к области бактериологии и иммунологии, главным образом по дифтерии, бешенству, холере. Он разработал метод приготовления иммунной сыворотки с большим содержанием дифтерийного антитоксина и вместе со своими учениками С.В. Коршуном и Г.Я. Остряниным организовал в Харькове производство противодифтерийной сыворотки. В.И. Недригайлов предложил один из методов иммунологической диагностики холеры и метод вакцинации против газовой гангрены (с использованием в качестве антигена не культуру микробов, а отделяемое из ран и мышц).

ОППЕЛЬ Владимир Андреевич (11.12.1872 — 07.10.1932), хирург, доктор медицины, профессор, действительный статский советник. Родился в семье известного пианиста и композитора, председателя Русского музыкального общества Андрея Алексеевича Оппеля. В 1896 г. окончил ВМедА и был оставлен адъюнктом в госпитальной хирургической клинике профессора В.А. Ратимова. В 1899 г. после защиты докторской диссертации о лимфангиомах был направлен в заграничную командировку, где работал в лабораториях у Р. Вирхова и И.И. Мечникова. По возвращении был старшим ассистентом в клинике, руководимой С.П. Федоровым. С 1908 г. заведовал кафедрой

хирургической патологии и терапии (с 1917 г. — кафедра общей хирургии), а с 1918 г. — академической хирургической клиникой ВМедА. Несколько месяцев В.А. Оппель был президентом академии. Одновременно (с 1919 по 1927 г.) возглавлял хирургическое отделение Радиорентгенологического института (ныне ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова»). Во время Первой мировой войны был хирургом-консультантом ряда фронтов. В 1927 г., являясь директором больницы им. И.И. Мечникова, организовал в ней крупное хирургическое отделение, а на его базе — 2-ю хирургическую кафедру Ленинградского ГИДУВа. В 1931 г. возглавил первую в СССР кафедру военно-полевой хирургии ВМедА.

В.А. Оппель был одним из основоположников военно-полевой хирургии в СССР, создал большую школу хирургов. К числу его учеников относятся М.Н. Ахутин, С.И. Банайтис, С.С. Гирголав, И.А. Клюсс, и другие. Он являлся председателем хирургического общества им. Н.И. Пирогова (Ленинград), избирался почетным членом Королевского медико-хирургического общества Англии.

САВЧЕНКО Иван Григорьевич (1862–1932) — советский иммунолог и патолог, микробиолог, профессор (1896), заслуженный деятель науки РСФСР (1928).

В 1888 г. окончил медицинский факультет Киевского университета и был приглашен помощником прозектора на кафедру общей патологии ВМедА, возглавляемую В.В. Подвысоцким. С 1889 г. — ассистент этой кафедры. В 1893 г. И.Г. Савченко защитил докторскую диссертацию на тему «Споровиковые чужеядные в злокачественных опухолях». В 1895 г. работал под руководством И.И. Мечникова в Институте Пастера в Париже. С 1896 по 1919 г. — заведующий кафедрой общей патологии Казанского университета. В 1919 г. вместе с Н.Н. Петровым и другими учеными участвовал в организации Бактериологического института и медицинского факультета Кубанского университета, кафедрой общей патологии которого руководил до конца жизни. И.Г. Савченко — автор свыше 100 научных работ, посвященных патологической анатомии, этиологии, патогенезу и иммунологии инфекционных болезней. Им исследованы воспалительные изменения костей и костного мозга при проказе (1890), патологоанатомические изменения при холере (1893). В 1893 г. совместно с Д.К. Заболотным И.Г. Савченко в опытах на себе показал эффективность перорального введения холерной вакцины, что положило начало энтеровакцинации с целью специфической профилактики кишечных инфекций. В области теоретической иммунологии особое значение имеет цикл исследований И.Г. Савченко по проблеме фагоцитоза, на которые ссылался И.И. Мечников в своих трудах «О невосприимчивости в инфекционных заболеваниях» и «О природе воспаления».

В 1905 г. И.Г. Савченко открыл скарлатинозный токсин, а в 1907 г. предложил оригинальный метод изготовления лошадиной противоскарлатинозной сыворотки. С 1920 г. он организует широкие эпидемиологические исследования в Краснодаре, производство холерной и брюшнотифозной вакцин для Красной Армии и тыла, возглавляет борьбу по ликвидации вспышек эпидемических заболеваний. К этому времени относятся его научные публикации о патогенезе малярии, эпидемиологии холеры и других инфекционных заболеваний.

ТАРАСЕВИЧ Лев Александрович (1868–1927) — отечественный эпидемиолог, микробиолог и общественный деятель. В 1891 г. окончил естественный факультет Новороссийского университета (Одесса), учился в ВМедА, завершил медицинское образование в Париже (1897). После кратковременного пребывания (1899) в Киевском университете на кафедре общей патологии у В.В. Подвысоцкого уехал в Париж, работал в лаборатории И.И. Мечникова, где подготовил докторскую диссертацию. В 1902 г. возвратился в Одессу, где позднее работал приват-доцентом кафедры общей патологии университета. В 1907–1911 гг. Л.А. Тарасевич стал приват-доцентом Московского университета, в 1908–1924 гг. читал курс бактериологии во 2-м Московском университете (до 1918 г. Высших женских курсах). Во время Первой мировой войны (1914–1918) был инициатором вакцинации против брюшного тифа и холеры в русской армии.

Л.А. Тарасевичу принадлежит более 70 научных работ по различным вопросам общей патологии, микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, прививочному делу, в том числе «Курс общей патологии» (1917) и ряд глав в первом русском трехтомном коллективном руководстве «Медицинская микробиология» (1912–1915), вышедшим под его редакцией. Он способствовал внедрению в нашей стране вакцинации против туберкулеза. По его инициативе в августе 1918 г. была создана первая в СССР станция по контролю бактерийных препаратов (Научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича). С 1918 г. он возглавлял Ученый медицинский совет Наркомздрава; был основателем и директором Государственного научного института народного здравоохранения (ГИНЗ) им. Пастера (в Москве). Л.А. Тарасевич был организато-

ром и бессменным председателем ряда съездов бактериологов, эпидемиологов и санитарных врачей.

ЧИСТОВИЧ Николай Яковлевич (1860–1926) — отечественный терапевт, инфекционист и микробиолог. После окончания в 1884 г. ВМедА был оставлен при терапевтической клинике, возглавляемой С.П. Боткиным. В 1887 г. защитил докторскую диссертацию, выполненную под руководством И.П. Павлова. В 1887–1890 гг. совершенствовался за границей у И.И. Мечникова, Р. Коха, Ф. Реклингхаузена, Э. Лейдена и др. С 1890 г. служил приват-доцентом, а затем — ассистентом факультетской терапевтической клиники ВМедА. С 1895 г. Н.Я. Чистович — главный врач больницы при Георгиевской общине медсестер в Петербурге. В 1898–1910 гг. руководил кафедрой общего учения о заразных болезнях с бактериологией ВМедА и одновременно с 1900 г. — кафедрой частной патологии и терапии Петербургского женского медицинского института (в настоящее время Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова). С 1910 г. и до конца жизни являлся начальником кафедры факультетской терапии ВМедА.

Н.Я. Чистович — автор свыше 90 научных работ, посвященных вопросам бактериологии, патоморфологии, патогенеза, клиники и лечения пневмоний и туберкулеза, особо опасных и других инфекционных болезней; изменениям крови при инфекционных болезнях; вопросам патоморфологии, симптоматики и диагностики заболеваний сердца, почек и мочевых путей, а также другим проблемам внутренних болезней. Он был сторонником клинико-экспериментального направления в медицине. Классическими признаны его исследования местного иммунитета и патогенности микроорганизмов. Н.Я. Чистович признан одним из основоположников клиники инфекционных болезней как научной дисциплины и предмета преподавания в России и СССР. Он создал клиническую школу, представителями которой были М.И. Аринкин, Н.К. Георгиевский, С.И. Златогоров, Н.К. Розенберг, С.М. Рысс, Н.Н. Савицкий и другие [9].

МАСЛАКОВЕЦ Петр Петрович (1871–1933) — соратник Г.Д. Белоновского, один из основателей института Пастера в Санкт-Петербурге [1]. Петр Петрович родился в 1871 г. в деревне Маслаковка Черниговской губернии. В 1891 г. он окончил классическую Черниговскую гимназию и поступил в Киевский университет, проучившись 2 курса; в 1894 г. перевелся на 3-й курс Петербургской Военно-Медицинской Академии, которую окончил в 1897 г. с отличием и званием лекаря.

В том же году Петр Петрович был зачислен младшим врачом в 165-й Ковельский пехотный полк. В 1899 г. вышел в отставку. Разжалован из военных врачей по делу «Союза борьбы за освобождение рабочего класса»; выслан на 3 года в Уржум Вятской губернии, где работал в земской больнице.

После ссылки в 1902 г. получил место заведующего колонией и лечебницей Красного Креста в Пятигорске; с 1903 г., кроме заведования учреждениями Красного Креста и руководства занятиями сестер милосердия, до 1905 г. занимал должность врача Пятигорской группы Кавказских Минеральных Вод. В 1905 г. Петр Петрович был арестован как член Революционного комитета Пятигорской Республики, однако затем освобожден на поруки, после чего выехал за границу.

В 1906 г. П.П. Маслаковец вернулся в Россию, работал в диагностической клинике Левина в Институте экспериментальной медицины (ИЭМ); получил премию за разработку техники реакции Вассермана; в феврале 1907 г. прослушал курс практической бактериологии при патолого-бактериологическом кабинете ИЭМ под руководством доктора Н.К. Шульца; с марта 1907 г. работал под руководством проф. Д.К. Заболотного в сифилидологической лаборатории ИЭМ; с июня по октябрь 1907 г. был совместно с Д.К. Заболотным командирован на эпидемию холеры в Астрахань и Самару, где под его руководством изучал малярию, холеру и чуму. После возвращения работал младшим ассистентом на кафедре бактериологии ИЭМ.

С 1908 г. П.П. Маслаковец работал совместно с Я.Ю. Либерманом и Г.Д. Белоновским в подразделении, которое в последующем станет Институтом Пастера, а Петр Петрович — заместителем директора. В 1909 г. П.П. Маслаковец стал доктором медицины, работал в Медицинском женском институте; с 1916 г. — ассистентом кафедры микробиологии, с 1921 г. — директором Севастопольского Бактериологического Института.

В 1922 г. П.П. Маслаковец получил предписание Первого Медицинского института о возвращении в Петроград на работу в качестве старшего ассистента. С 1922 г. он работал старшим прозектором кафедры микробиологии; с 1923 г. — старшим преподавателем, в 1926–1928 гг. заведовал кафедрой, замещая профессора Д.К. Заболотного; с 1928 по 1931 г. был заведующим кафедрой микробиологии Первого Медицинского института.

В 1926 г. П.П. Маслаковец Наркомздравом был командирован в Париж в Пастеровский институт, где проработал 2,5 месяца. С 1929 г. Петр Петрович занимал должность приват-доцента и заведующего эпидемиологическим отделом Института имени Пастера в Санкт-Петербурге.

ЦИКЛИНСКАЯ Прасковья Васильевна (1859–1923) — отечественный бактериолог, первая русская женщина профессор бактериологии [3]. После окончания гимназии несколько лет работала учительницей начальной школы. В 1889 г. окончила физико-математический факультет Высших (Бестужевских) женских курсов и продолжала образование в Париже, с большим трудом добившись права поступить на первые бактериологические курсы в Пастеровском институте, которыми руководили Э. Ру, А. Лаверан и И.И. Мечников. Окончив курсы, осталась в Институте и в течение трех лет вела научную работу под руководством И.И. Мечникова. Возвратившись в Россию, поступила препаратором в основанный Г.Н. Габричевским Бактериологический институт Московского университета (ныне Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора).

В 1902 г. в Женевском университете защитила диссертацию «Исследования в области изучения термофильных микробов» на соискание ученой степени доктора естественных наук. С 1908 г. заведовала кафедрой бактериологии медицинского факультета Московских высших женских курсов и одновременно работала в Бактериологическом институте Московского университета.

П.В. Циклинская — автор большого числа работ по вопросам общей и медицинской микробиологии. Ее важнейшие труды посвящены изучению нормальной микрофлоры кишечника человека, ее изменений в зависимости от возраста, питания и других условий, а также антагонистических взаимоотношений микроорганизмов. Большую ценность представляют ее исследования микрофлоры кишечника у детей, в частности роли бифидобактерий у новорожденных, этиологии диспепсий и др. Работы П.В. Циклинской «О гемолизинах бактерий», «О цитотоксических свойствах кровяной сыворотки» и поныне не утратили своего значения. Ее исследования способствовали развитию нового направления в медицинской микробиологии — гнотобиологии. За работы в области медицинской микробиологии П.В. Циклинской в 1917 г. Московским университетом была присвоена степень доктора медицины без защиты диссертации.

ШПЕРК Эдуард-Леонард Фридрихович (1837–1894) родился в городе Мглин Черниговской губернии (ныне Брянская область) в семье энтомолога и минеролога Фридриха (Федора) Андреевича Шперка [6]. В 1855 г. окончил медицинский факультет Харьковского университета с отличием и одновременно успешно сдал экзамены на степень доктора медицины. В течение 10 лет работал на Дальнем Востоке. В 1860 г. он отправился в экспедицию по Николаевскому округу на Камчатку для изучения распространения проказы по берегам Охотского моря. Собранные материалы помогли Э.Ф. Шперку подготовить работу «Медико-топографические замечания о сифилисе Северо-Восточной Сибири» для получения степени доктора медицины, которую он успешно защитил в 1863 г. Это было одно из первых исследований по медицинской географии, поэтому в диссертации отсутствовали цитаты других авторов. Из-за этого ее едва не отклонили, и лишь благодаря ходатайству Я.А. Чистовича удалось допустить Э.Ф. Шперка к защите.

Работая в Калинкинской больнице, ученый провел уникальную работу: с 1871 по 1876 г. он подробно обследовал 1076 проституток и наблюдал их в течение 15 лет. Ученый пытался выявить графический эквивалент развития и протекания конкретной патологии. Результаты проведенной работы были оценены профессором Э. Лансеро (E. Lancereaux, 1829–1910), который написал в предисловии к собранию сочинений Э.Ф. Шперка: «Он один из тех редких авторов, которые понимают, как важно познание этиологических условий болезней для достижения предупреждения их, и которые стараются всеми средствами определить их происхождение. Но этим не ограничивались изыскания этого любознательного и образованного ума. Он занимался еще применением электричества к лечению болезней и с жаром отдавался изучению бактериологии, недавно основанной интересными исследованиями Л. Пастера».

Будучи главным врачом Калинкинской больницы, Э.Ф. Шперк продолжал заниматься исследованиями в области сифилиса. Специально для этой работы принцем А.П. Ольденбургским была приобретена партия обезьян из 36 животных. Однако в большинстве случаев эксперименты не увенчались успехом. И лишь после поездки в Париж, где Э.Ф. Шперк обсуждал проблему создания экспериментальной модели сифилиса с Л. Пастером, он попытался применить комбинацию возбудителя сифилиса с иным микроорганизмом, надеясь таким образом понизить иммунитет обезьян. В результате у обезьян возникали характерные язвы. Эти работы дали убедительное доказательство прививаемости человеческого сифилиса обезьяне и возможность дальнейших пассажей от обезьяны к обезьяне, что послужило началом большой исследовательской работы ряда ученых в области изучения сифилиса.

БАРДАХ Яков Юльевич (1857–1929) — врач, выдающийся микробиолог, родился в Одессе в семье учителя. После Ришельевской гимназии он поступил на Естественное отделение Физико-математического факультета Новороссийского университета, где под руковод-

ством И.И. Мечникова изучал биологию [7]. За студенческую научную работу «Об оптических изомерах яблочных кислот» он был удостоен золотой медали. Окончив университет в 1880 г., Яков Юльевич поступил в Военно-медицинскую академию в Петербурге для получения медицинского образования. Из академии был выпущен в 1883 г. в звании лекаря, окончил курс с отличием.

Возвратившись в Одессу, Яков Юльевич начал работать в небольшой микробиологической лаборатории И.И. Мечникова, организованной на квартире Ильи Ильича. Через два года усилиями Мечникова и его учеников и в основном на средства Одесского городского управления была создана первая в России и вторая в мире (после Пастеровского института в Париже) бактериологическая лаборатория, открывшаяся 11 июня 1886 г. Станция занималась приготовлением вакцины против сибирской язвы, исследованием причин чумы и других заразных болезней рогатого скота. Когда надо было испытать полученную прививку против бешенства, Я.Ю. Бардах первым испытал ее на себе.

В 1981 г. одесская городская управа объявила конкурс на замещение должности заведующего бактериологической станцией и обратилась к самому Л. Пастеру за советом о кандидатуре на этот пост. Ответ пришел быстро. Л. Пастер написал: «...Позвольте мне обратить Ваше внимание на то, что вы у себя под рукою имеете выдающегося ученого, который заявил о себе в последние годы важными научными работами и как заведующий Одесским институтом для прививок против бешенства получил прекрасные результаты, обратившие внимание всех институтов этого профиля. Одесская управа не могла бы поступить лучше, как доверить заведывание бактериологической станцией доктору Бардаху».

В 1891 г. Я.Ю. Бардах вновь побывал в Париже, чтобы поработать в Пастеровском Институте, где получил от Пастера приглашение занять место сотрудника антирабического отделения института. Однако Яков Юльевич не согласился на столь лестное предложение. Вернувшись в Одессу, он начал работать на станции по профилактике и лечению дифтерии. В 1894 г. защитил докторскую диссертацию в Московском университете. Это была первая в России работа по серотерапии (метод лечения инфекционных заболеваний при помощи иммунных сывороток).

В 1910 г. в Одессе вспыхнула эпидемия холеры. Бригады скорой медицинской помощи (СМП) были экстренно обучены правилам оказания помощи холерным больным. В годы Первой мировой войны при СМП были открыты курсы для сестер милосердия, на которых читал лекции Я.Ю. Бардах. После Октябрьской революции Я.Ю. Бардах был утвержден профессором кафедры микробиологии. В этой должности он оставался до дня смерти.

Все российские ученые — ученики Луи Пастера и его друга и соратника И.И. Мечникова — продолжали дело служения обществу благодаря великим достижениям в области микробиологии. Свои знания и опыт они передавали многочисленным ученикам — продолжателям дела великого ученого Луи Пастера.

## Список литературы/References


1. Алексеева Н.Г., Тотолян Арег А. Юбилейный 2018: 110-летие со дня основания Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и 95-летие со дня присвоения Институту имени Пастера // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 4. С. 408–417. [Alekseeva N.G., Totolian Areg A. Jubilee 2018: 110th anniversary of the foundation of the St. Petersburg Pasteur research institute of epidemiology and microbiology and the 95th anniversary of the naming of the institute after Pasteur. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 408–417. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-408-417*
2. Иванов С.А. Русские ученые в Пастеровском институте. Письма из Парижа // Природа. 1977. № 7. С. 93–96. [Ivanov S.A. Russian scientists at Pasterovsky institute. Letters from Paris. *Priroda = The Nature, 1977, no. 7, pp. 93–96. (In Russ.)*]
3. Игнатова А.И. Наследие Прасковьи Васильевны Циклинской для преподавания бактериологии во Втором МГУ: малая наука в мировом масштабе // История науки: источники, памятники, наследие: третьи чтения по историографии и источниковедению истории науки и техники: к 150-летию со дня рождения Владимира Леонтьевича Комарова (1869–1945): Материалы международной научной конференции, Москва, 15–17 октября 2019 года. М.: ООО Изд-во «Янус-К», 2019. С. 398–402. [Ignatova A.I. Praskovia Vasilyevna Tsiklinskaya's legacy for teaching bacteriology at Second MSU: small science on a global scale // Science History: sources, monuments, heritage: the third readings on a historiography and a source study of history of a science and technics: to the 150 anniversary from the date of birth of Vladimir Leontevich Komarov (1869–1945): Materials of the international scientific conference, Moscow, on October, 15–17th, 2019. *Moscow: Janus-K, 2019, pp. 398–402. (In Russ.)*]
4. Карапац М.М., Краева Л.А. Ученики Пастера из России // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 4. С. 418–424. [Karapats M.M., Kraeva L.A. Disciples of Pasteur from Russia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 418–424. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-418-424*
5. Колотилова Н.Н. К 200-летию со дня рождения Луи Пастера. Выставка в Музее землеведения МГУ // Жизнь Земли. 2022. Т. 44, № 4. С. 498–504. [Kolotilova N.N. To the 200 anniversary from the date of a birth of Lui Pasteur. An exhibition in the Museum of physical geography of the Moscow State University. *Zhizn' Zemli = Life of the Earth, 2022, vol. 44, no. 4, pp. 498–504. (In Russ.)*]

6. Мазинг Ю.А., Андрюшкевич Т.В. Создание института, подобного Пастеровскому в Париже (к 125-летию указа Императора Александра III) // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2013. Серия 11, № 4. С. 226–254. [Mazing J.A., Andrjushkevich T.V. Creation of the institute similar to Pasterovsky in Paris (to the 125 anniversary of the decree of Emperor Alexander III). *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = The Bulletin of the St. Petersburg University, 2013, Series 11, no. 4, pp. 226–254. (In Russ.)*]
7. Миленушкин Ю.И. Бардах Яков Юльевич // Большая медицинская энциклопедия. Под ред. Б.В. Петровского. 3-е изд. М.: Советская энцикопедия, 1975. Т. 2. С. 559. [Milenushkin Yu.I. Bardach Jakow Julevich. In: Great Medical Encyclopedia; Ed. B.V. Petrovskii; 3rd ed. *Moscow: Sovetskaya Entsikopediya, 1975. Vol. 2. P. 559. (In Russ.)*]
8. Российская военно-медицинская академия (1978–1998). Под ред. Ю.Л. Шевченко. СПб.: ВМедА, 1998. 728 с. [Russian Military Medical Academy (1978–1998). Ed. by J.L. Shevchenko. *St. Petersburg, 1998. 728 p. (In Russ.)*]
9. Сбойчаков В.Б., Карапац М.М. 100 лет кафедре микробиологии ВМедА. Под ред. Гумилевского Б.Ю. СПб., 2023. 88 с. [Sbojchakov V.B., Karapats M.M. 100 years to chair of microbiology of Military medical academy. Ed. by Gumilevsky B.Yu. *St. Petersburg, 2023. 88 p. (In Russ.)*]

**Авторы:**
**Карапац М.М.**, к.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 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.

**Authors:**
**Karapats M.M.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, 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.

Поступила в редакцию 03.05.2023
Принята к печати 10.07.2023

Received 03.05.2023
Accepted 10.07.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 4, pp. 787–796
Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 4, с. 787–796

# 35-ЛЕТИЕ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ОКРУЖНОГО ЦЕНТРА ПО ПРОФИЛАКТИКЕ И БОРЬБЕ СО СПИД В СТРУКТУРЕ НИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА

**Н.А. Беляков[1,2], С.В. Огурцова[1], В.В. Рассохин[1,2], Д.А. Лиознов[2,3], Е.В. Ястребова[1,2], Е.В. Боева[1,2], А.А. Тотолян[1,2]**

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Организация Северо-Западного окружного Центра по профилактике и борьбе со СПИД (СЗО Центр СПИД) берет свое начало на истоках зарождения эпидемии ВИЧ в Российской Федерации. За период 35-летней работы сотрудниками СЗО Центра СПИД был внесен неоценимый вклад в развитие диагностики ВИЧ-инфекции, внедрении новых клинических и профилактических технологий, консультирования пациентов и подготовки квалифицированных кадров. В юбилейной статье освещены основные этапы становления СЗО Центра СПИД как структурной единицы Санкт-Петербургского научно-исследовательского института имени Пастера. Рассмотрены разносторонние функции и задачи организации, носящие мультидисциплинарный характер, ее основные достижения всероссийского и мирового масштаба. Особое внимание уделено многолетнему международному сотрудничеству, результатам реализации различных программ и проектов при поддержке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Объединенной программы Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИД. СЗО Центр СПИД продолжает взаимодействие с основными научными организациями Санкт-Петербурга: Первым Санкт-Петербургский государственным медицинским университетом имени И.П. Павлова, Институтом экспериментальной медицины, Институтом мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН и др. Проводимые совместные исследования неизменно вносят вклад в изучение эпидемиологии и клиники различных вирусных инфекций и коморбидных состояний. Полученные знания регулярно обобщаются в виде монографий, журнальных статей и демонстрируются на конференциях различного уровня. В настоящее время СЗО Центра СПИД представлен несколькими структурными подразделениями, в которой продолжается практическая и научная деятельности по изучению ВИЧ и вирусных гепатитов.

***Ключевые слова:*** *Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД, ВИЧ-инфекция, этапы развития, эпидемиология, научная деятельность.*

**Адрес для переписки:**
Боева Екатерина Валериевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 911 792-91-94.
E-mail: kathrine.boeva@gmail.com

**Contacts:**
Ekaterina V. Boeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 792-91-94.
E-mail: kathrine.boeva@gmail.com

**Для цитирования:**
Беляков Н.А., Огурцова С.В., Рассохин В.В., Лиознов Д.А., Ястребова Е.В., Боева Е.В., Тотолян А.А. 35-летие Северо-Западного окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД в структуре НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 787–796. doi: 10.15789/2220-7619-TTA-15394

**Citation:**
Belyakov N.A., Ogurtsova S.V., Rassokhin V.V., Lioznov D.A., Yastrebova E.V., Boeva E.V., Totolian A.A. The 35th anniversary of the North-Western District center for AIDS prevention and control at the St. Petersburg Pasteur Institute // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 787–796. doi: 10.15789/2220-7619-TTA-15394



**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TTA-15394

# THE 35th ANNIVERSARY OF THE NORTH-WESTERN DISTRICT CENTER FOR AIDS PREVENTION AND CONTROL AT THE ST. PETERSBURG PASTEUR INSTITUTE

**Belyakov N.A.[a,b], Ogurtsova S.V.[a], Rassokhin V.V.[a,b], Lioznov D.A.[b,c], Yastrebova E.V.[a,b], Boeva E.V.[a,b], Totolian A.A.[a,b]**

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*
[c] *Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** The organization of the North-Western District Center for AIDS Prevention and Control (AIDS Center) originates from the onset of the HIV epidemic in the Russian Federation. Over the 35 years of work, the staff of the AIDS Center has made an invaluable contribution to the development of HIV diagnostics, the introduction of new clinical and preventive technologies, patient counseling, and training of qualified personnel. The anniversary article highlights the main stages regarding establishment of the AIDS Center as a structural unit of the St. Petersburg Pasteur Research Institute. The versatile naturally multidisciplinary functions and tasks related to the AIDS Center organization, its major Russia-wide and global achievements are considered. Special attention is paid to the long-term international cooperation, the results of diverse implemented programs and projects supported by the World Health Organization (WHO) as well as the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. The AIDS Center continues to cooperate with the main scientific facilities such as the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Institute of Experimental Medicine, N.P. Bekhtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, etc. The ongoing joint research invariably contributes to assessing the epidemiology and clinical course of various viral infections and comorbid conditions. The knowledge acquired becomes regularly summarized and published in a series of monographs, journal articles being presented demonstrated at conferences of various levels. Currently, the AIDS Center is represented by several structural divisions continuing to conduct practical and scientific activities on investigating HIV and viral hepatitis.

***Key words:*** *North-Western District Center for the Prevention and Control of AIDS, HIV infection, stages of development, epidemiology, scientific activity.*

В 2023 г. исполнилось 35 лет с момента организации Северо-Западного окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (далее — Центр). С 1989 г. Центр начал функционировать на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и стал его структурной единицей. Организатором и руководителем лаборатории по диагностике ВИЧ-инфекции в 1988 г. стал заместитель директора по научной работе Ленинградского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера профессор Фридрих Савельевич Носков, который был первым инициатором создания службы профилактики и борьбы со СПИД на Северо-Западе РСФСР. Со своими коллегами и учениками Фридрих Савельевич сформулировал ряд идей по санитарно-эпидемиологическому надзору за СПИД и СПИД-ассоциированными инфекциями. На базе лаборатории в 1989 г. в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РСФСР № 62 от 24.04.89 г. «Об организации службы профилактики СПИДа в РСФСР» был организован и в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РСФСР от 25 июля 1989 г. № 119 «О развитии службы профилактики СПИДА в РСФСР» приступил к работе Ленинградский, а затем Северо-Западный, региональный центр по профилактике и борьбе со СПИД. Согласно Приказу Минздрава, Региональный центр по профилактике и борьбе со СПИД осуществляет консультативную и методическую функцию по вопросам научно-исследовательской, организационно-методической и лечебной работе, проводимой в Северо-Западном федеральном округе (СЗФО), внедряет и использует методы профилактики, диагностики и лечения ВИЧ-инфекции.

Лаборатория была усилена вновь организованными отделениями (отделение диагностики ВИЧ-инфекции, отделение эпинадзора и профилактики ВИЧ-инфекции), было выделено 18 дополнительных ставок для его специалистов (рис. 1).

На начальных этапах работы Центра наиболее важным разделом была организация диагностики ВИЧ-инфекции, в том числе доставки спорных и положительных сывороток для арбитражного исследования на ВИЧ-инфекцию. Уже за первые два месяца работы Центра поступила сотня сывороток для исследования на ВИЧ-инфекцию, из которых две по данным иммуноблоттинга оказались ВИЧ-положительными. Центр совместно с Ленинградской противочумной станцией срочно разработал оригинальный элюирующий раствор, поскольку исследования пальцевых проб были недостаточно эффективны.

Первое совещание с территориальными органами здравоохранения по СПИД было проведено в г. Петрозаводске в сентябре 1989 г., а уже в октябре территориальные центры СПИД были организованы в 7 регионах: в Архангельской (руководитель — Л.П. Жилина), Калининградской (А.Г. Кондудин), Новгородской (А.М. Жиляков),

Псковской (Г.Н. Винокуров), Мурманской (М.Л. Амозов) областях, в Карельской СССР (А.А. Гаврилов), в Ленинграде (Г.В. Богоявленский).

С 1990 г. Северо-Западный региональный центр по профилактике и борьбе со СПИД возглавила Татьяна Тимофеевна Смольская — доктор медицинских наук (1985), заслуженный врач Российской Федерации (2005).

Как руководитель и непосредственный исполнитель, она вложила свои знания и энергию в организацию Центра и становление службы СПИД на базе учреждений практического здравоохранения на 11 административных территориях СЗФО России. Татьяна Тимофеевна была автором около 200 научных работ, 7 изобретений, награждена почетной грамотой Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, являлась членом научных комитетов крупнейших международных конференций по СПИД, входила в состав координационных комитетов и экспертных групп ряда масштабных международных проектов: проект Европейского союза по эпиднадзору за ВИЧ/СПИД в Европе, проект «Северное измерение», проект Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в Загребе — «Обучающий Центр по эпиднадзору второго поколения для стран Центральной и Восточной Европы», проект по ВИЧ/СПИД в Балтийском регионе и на Северо-Западе России и др. Под руководством Татьяны Тимофеевны в Центре начали регулярно издаваться информационные бюллетени, аналитические обзоры, методические пособия и рекомендации для врачей. С 1996 г. в Центре начал работать кабинет «Доверие» — один из первых анонимных кабинетов в стране для консультирования и добровольного тестирования на ВИЧ и ВИЧ-ассоциированные заболевания.

На первом этапе эпидемии (до 1997 г.), когда распространение ВИЧ-инфекции в России имело характер очаговой заболеваемости, научно-практическая деятельность Центра осуществлялась по следующим направлениям:

– участие в разработке Федеральных документов по организации деятельности службы по ВИЧ-инфекции в РФ;

– издание информационных материалов для медицинских работников;

– содействие в организации на 11 административных территориях Областных/Республиканских Центров по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (далее Центр СПИД), территориальных программ АнтиСПИД. Так, в эти годы на территориях СЗФО было организовано около 100 лабораторий, из которых все первично-положительные образцы крови поступали в референс-лабораторию Регионального центра для подтверждения диагноза ВИЧ-инфекции. На базе Центра врачи территориальных лабораторий СПИД проходили дополнительную теоретическую подготовку и кратковременное обучение на рабочем месте;

– разработка в Центре новых диагностических тестов на ВИЧ на основе гемагглютинационных методов и ИФА, а также полевых методов забора образцов крови («сухая капля»);

– проведение базовых исследований по ДНК-гибридизации и ПЦР, а также сравнительные исследования методов определения вирусной нагрузки (bDNA и RT-PCR);

– обобщение и анализ результатов скрининга на ВИЧ в Северо-Западном федеральном округе, анализ отдельных случаев ВИЧ-инфекции и эпидпроцесса в целом; с 1992 г. на постоянной основе ведется и анализируется база эпидемиологических данных по случаям ВИЧ-инфекции в СЗФО и регулярно выпускаются Информационные бюллетени/Аналитические обзоры;

– разработка методов и программных средств для анализа и прогнозирования развития эпидемии на территориях с низким уровнем инфицирования населения.

**Рисунок 1. Сотрудники Регионального Центра СПИД, 1993 г.**

Figure 1. Employees of the Regional AIDS Center, 1993

**Примечание**. В нижнем ряду, посередине: Т.Т. Смольская, руководитель Центра, доктор медицинских наук, заслуженный врач Российской Федерации и Ф.С. Носков; второй ряд, слева направо: В.Г. Елисеева, В.А. Райская, Г.И. Коровина, В.И. Федотова, М.М. Леонтьева, Н.А. Гладкова, Н.П. Лещинская, Т.Л. Затолокина; верхний ряд, слева направо: Ж.В. Терентьева, М.О. Лубкина, Э.А. Шилова, Е.Н. Рушневская, А.В. Закревская.

Note. Bottom row, in the middle: T.T. Smolskaya, Head of the Center, Doctor of Medical Sciences, Honored Doctor of the Russian Federation and F.S. Noskov; second row, from left to right: V.G. Eliseeva, V.A. Raiskaya, G.I. Korovina, V.I. Fedotova, M.M. Leontieva, N.A. Gladkova, N.P. Leshchinskaya, T.L. Zatolokina; top row, from left to right: Zh.V. Terentyeva, M.O. Lubkina, E.A. Shilova, E.N. Rushnevskaya, A.V. Zakrevskaya.

В 1990 г. Институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Областная инфекционная больница в поселке Усть-Ижора Ленинградской области и кафедра инфекционных болезней Медицинской академии

последипломного образования (профессор А.Г. Рахманова) стали инициаторами создания в этой больнице стационара для инфицированных детей и взрослых, в том числе для пока еще немногочисленных в то время пациентов с административных территорий СЗФО, которые наблюдались клиницистом Окружного центра.

В 1994–1996 гг. при поддержке специалистов Института Пастера в Париже и Национального института здравоохранения Финляндии были проведены исследования по генотипированию штаммов ВИЧ, циркулирующих на территориях Северо-Запада и в других областях России; исследование показало присутствие в коллекции всех известных на тот период субтипов ВИЧ и рекомбинантных форм вируса, а также была прослежена последовательность вхождения в циркуляцию разных штаммов ВИЧ; двадцать одна оригинальная последовательность V3 домена из указанной коллекции была депонирована в Международном Генбанке (U69646-U699667) (рис. 2).

Второй — основной этап эпидемии начался во второй половине 1990-х гг., когда ВИЧ на многих территориях попал сначала в быстрорастущую популяцию потребителей инъекционных наркотиков (ПИН), далее к их половым партнерам, в группы секс-работниц, зачастую являвшихся наркопотребителями.

СЗФО по степени пораженности населения ВИЧ-инфекций занял устойчивое второе место среди других Федеральных округов России в основном за счет эпидемии в городах Калининград, Санкт-Петербург и в Ленинградской области. Исследование генома вируса, вызвавшего взрывоподобную эпидемию в Калининградской области в 1996–1997 гг. показало генетическую гомогенность собранной коллекции, представленной рекомбинантной формой вируса (A/B).

**Рисунок 2. Подготовка врачей лаборантов на базе Центра. Проводит обучающий семинар Франсуаза Барре-Синусси (Франция, вторая слева), которая в 1983 г. совместно с Л. Монтанье идентифицировали ВИЧ (Нобелевская премия, 2008 г.)**

Figure 2. Training of laboratory doctors at the AIDS Center. A training seminar conducted by Francoise Barre-Sinoussi (France, second from left), who in 1983, together with L. Montagnier, identified HIV (Nobel Prize, 2008)

Дальнейшие фенотипические исследования позволили предположить, что субтипы ВИЧ А и В, циркулирующие в Украине, могли быть «родителями» Калининградского штамма (CRF03-AB). Последующие исследования Центра в 2003 и 2006 гг. на территориях СЗФО показало присутствие этого варианта вируса вне Калининграда только в г. Череповце (Вологодская область).

Для изучения движущих сил эпидемии и обоснования профилактики в условиях нарастающего распространения ВИЧ, Центр при поддержке Объединенной программы Организации объединенных наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙД) и ВОЗ в дополнение к действующей системе надзора начал активно развивать и внедрять методологию второго поколения эпидемиологического надзора за ВИЧ в РФ («комплексные сероэпидемиологические и поведенческие исследования в уязвимых группах»), которая включала:

– исследования в группах населения, которые в силу социальных причин или рискованного поведения являются высоко уязвимыми к ВИЧ: ПИН, их половые партнеры, секс-работницы и их клиенты, мужчины, практикующие секс с мужчинами (МСМ) и др.;
– проведение исследований в «дозорном» формате — в короткие сроки, вне медицинских учреждений, на участках, условно названных «дозорными», которые были приемлемыми для посещения жителями, включая представителей уязвимых групп (специально оборудованные помещения, мобильные пункты и др.);
– усиление биологического компонента надзора за счет обследования образцов крови не только на ВИЧ, но и на антитела к вирусу гепатита С и возбудителю сифилиса;
– введение поведенческого и психологического компонентов (социологический опрос), что потребовало объединение усилий эпидемиологов, психологов и социологов.

Все исследования, описанные ранее, были проведены в России впервые.

В 2000 г. в соответствии с Приказом МЗ РФ № 312 от 07.08.2000 г. «О совершенствовании организационной структуры и деятельности учреждений по профилактике и борьбе со СПИД» Северо-Западный региональный центр по профилактике и борьбе со СПИД был преобразован в Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД (СЗО Центр СПИД).

Первое поисковое исследование, проведенное Центром в Санкт-Петербурге (1998–2001 гг.), позволило поставить диагноз скрытой, но интенсивно протекающей эпидемии ВИЧ-инфекции среди наркопотребителей (распространенность ВИЧ среди ПИН в 1998 г. — 12,0%, в 2000 г. — 19,3%, в 2001 г. — 36,7%) [8].

В 2002 г. исследования по указанной методике среди ПИН, но с расширенным и стандартизованным поведенческим компонентом

было проведено одновременно на пяти территориях Российской Федерации в соответствии с программами по снижению вреда. Оно позволило определить распространенность ВИЧ-инфекции среди ПИН в городах Ростов-на-Дону (10,9%), Самара (28,0%), Тверь (55,7%), Екатеринбург (30,0%) и Иркутск (59,8%), выявить стадию и специфику эпидемии на каждой территории по многим показателям и представить «усредненный портрет» наркопотребителя в указанные годы (рис. 3)

Начиная с 2003 г. реализовывались интегрированные исследования с включением в целевые группы женщин, вовлеченных в коммерческий секс в ряде мегаполисов страны (Санкт-Петербург, Москва, Екатеринбург, Томск и др.), и МСМ (Екатеринбург, Томск). Рабочие группы были созданы на базе Центров по профилактике и борьбе со СПИД с привлечением неправительственных организаций. В Санкт-Петербурге был обнаружен необычайно высокий уровень инфицирования ВИЧ в группе уличных работниц коммерческого секса (48,1%). Причиной этого явилось сочетание двух факторов риска — продажа секс-услуг и наркопотребление (92,0%). Пораженность ВИЧ в Москве и Екатеринбурге оказалась ниже и сопоставимой (14,1 и 14,8% соответственно) в связи с низкой частотой употребления наркотиков. МСМ в Екатеринбурге и Томске практиковали в равной степени высокорискованное сексуальное поведение, однако ВИЧ инфекция была выявлена среди МСМ только в Екатеринбурге (4,8%) ввиду более высокого присутствия ВИЧ-инфицированных в их социальном окружении.

В 2004 г. дозорные исследования позволили оперативно уточнить эпидемиологическую ситуацию одновременно на 9 территориях Северо-Запада в следующих городах России:

– среди ПИН — Архангельск, Череповец, Псков, Великий Новгород;
– среди посетителей мобильных пунктов профилактических программ — Ленинградская область, Мурманск;
– среди студентов — Калининградский университет;
– среди учащихся техникумов и среди лиц, призываемых в армию, — Санкт-Петербург.

В исследовании, проведенном в Санкт-Петербурге в 2005 г. совместно с общественной организацией «Врачи детям», было впервые показано, что в условиях меняющейся с начала 90-х гг. социальной ситуации высокоуязвимой группой в отношении наркомании и ВИЧ-инфекции являются дети и подростки, находящиеся в сложной жизненной ситуации.

Реализация в 2006–2007 гг. проекта среди МСМ — посетителей гей-клубов и гей-саун — в Москве и Санкт-Петербурге показала, что вирус пока еще незначительно распространился в этой группе в Москве (0,93%) и в Санкт-Петербурге (3,8%), однако крайне рискованные практики в моделях сексуального поведения представителей этих групп свидетельствуют о том, что они остро нуждаются в профилактических программах.

Инновационным явился проект, реализованный в 2006–2007 гг. среди ВИЧ-позитивных женщин на пяти высокопораженных территориях страны — Санкт-Петербург, Екатеринбург, Тверь, Калининград и Иркутск. Ретроспективный анализ их социальной принадлежности и причин высокой уязвимости к ВИЧ показал, что совокупная выборка инфицированных ВИЧ людей была представленной как собственно лицами из групп высокого риска (ПИН, коммерческие секс-работники, ПИН, продающие секс-услуги), так и лицами, имеющими сексуальную связь с представителями указанных групп.

Основным выводом по этому проекту стала рекомендация организации поведенческих исследований среди так называемого «основного» населения, для изучения распространения моделей поведения актуальных в плане заражения ВИЧ. Сотрудники Центра участвовали как консультанты на этапе планирования и оценки результатов в проектах, реализовывавшихся на других территориях РФ (Нижний Новгород, Волгоград, Барнаул, Рубцовск, Бийск), а также в странах СНГ (Кыргызстан, Молдова, Азербайджан, Туркменистан). Одной из целей, для которых использовались данные дозорного исследований, была оценка реальной распространенности и прогноза развития эпидемии на территориях СЗФО с использованием методов и компьютерных программ референс-группы ЮНЭЙДС по математическому моделированию. Результаты комплексных интегрированных исследований были использованы в отчетах Российской Федерации о ходе выполнения Международной Декларации о приверженности делу борьбы с ВИЧ/СПИДом.

**Рисунок 3. Руководитель Центра профессор Т.Т. Смольская и врач-эпидемиолог С.В. Огурцова, 2002 г.**

Figure 3. Professor T.T. Smolskaya, Head of the AIDS Center, and S.V. Ogurtsova, epidemiologist, 2002

В рамках совместной работы с Международным образовательным Центром по эпиднадзору за ВИЧ (Загреб, Хорватия) при поддержке ЕвроВОЗ для русскоговорящих слушателей была адаптирована версия трех Международных модулей по второму поколению эпиднадзора за ВИЧ-инфекцией (2006 г.).

Проводились совместные Международные обучающие семинары по эпиднадзору за ВИЧ в Украине и России (2009 г.). Для слежения за динамикой эпидемии и определения истинной заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Окружном центре была проведена работа по изучению алгоритмов серологического тестирования на ВИЧ для определения недавней сероконверсии (STARHS). Для улучшения медицинской помощи пациентам, проживающим на территории Округа, в практику Центра введены исследования по определению первичной резистентности циркулирующих штаммов ВИЧ к антиретровирусным препаратам, а также определения резистентности вируса у лиц с неуспешной терапией.

С 2006 г. в стране реализовывался Приоритетный национальный проект «Профилактика и лечение больных ВИЧ». Наиболее важные результаты были получены по медицинской составляющей проекта (обеспечение терапией, снижение летальности ниже прогнозируемого уровня, снижение коэффициента перинатальной трансмиссии).

С целью более объективного анализа организации профилактики СЗО Центр СПИД совместно с региональной общественной организацией (РОО) «Стеллит», провел социологическое исследование по вопросам профилактики среди руководителей территориальных Центров СПИДа России, с использованием полуструктурированного опросного листа. Исследованием было охвачено 84 административные территории (август 2009 г.). Идея комбинированной профилактики была развита в последующие два года и представлена на конференции в Вене (2010 г.) уже в виде разрабатываемого нового стандарта — долгосрочных мер по борьбе с эпидемией.

С 2009 г. в лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции велись исследования по выявлению мутаций ВИЧ, ассоциированных с устойчивостью к лекарственным препаратам. Эти исследования выполняются в соответствии с заявками территориальных Центров по профилактике и борьбе со СПИД СЗФО.

Результаты исследования популяции ВИЧ-инфицированных людей в СЗФО сводились в единую базу данных для проведения ретроспективного анализа тенденций развития первичной и вторичной резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам. Анализ результатов исследований на наличие лекарственной устойчивости ВИЧ позволил выявить некоторые из наиболее распространенных мутаций: M184V (51,08%), K103N (18,71%), L74V (12,95%), K101E (11,51%), A62V и G190S (10,79%), остальные мутации встречаются менее чем в 10% случаев [6, 7].

Перспективным направлением работы является определение генетических маркеров устойчивости к заражению ВИЧ и маркеров прогрессирования ВИЧ-инфекции. Проводятся исследования по определению маркеров генетической резистентности к ВИЧ: CCR5delta32 и мутации CCR2–64I– методом пиросеквенирования. Изучение этих лабораторных маркеров представляет особый интерес для СЗФО, поскольку генетически этот регион принадлежит к зонам максимальной распространенности мутации CCR5delta32. По данным предварительных исследований, распространенность носительства аллели CCR5delta32 в Санкт-Петербурге составляла 17,9%.

В течение четырех лет (2005–2009 гг.) СЗО Центр СПИД выполнял проекты «Поддержка реализации и мониторинг мероприятий проекта Международного банка реконструкции и развития», «Профилактика, диагностика и лечение туберкулеза и СПИДа, компонент СПИД». В соответствии с техническим заданием по этому проекту, сотрудники Центра за указанный период осуществили 30 выездов на подведомственные территории. В виду отсутствия стабилизации эпидемии ВИЧ-инфекции среди задач Центра на первый план выдвигается проблема социальной профилактки ВИЧ-инфекции.

Сотрудники Центра ежегодно участвовали и сами организовывали российские и международные конференции, семинары, симпозиумы.

После ухода Т.Т. Смольской с должности с 2014 г. Центр возглавил д.м.н. Дмитрий Анатольевич Лиознов, который укрепил творческие связи с Первым Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом имени академика И.П. Павлова (ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова) и усилил российско-гвинейское сотрудничество в области изучения инфектологии; имеет благодарность Президента Российской Федерации (2016) (рис. 4).

Заведующий лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции СЗО Центра СПИД, д.б.н. Александр Владимирович Семенов Указом Президента Российской Федерации за большой вклад в оказание гуманитарной помощи по организации комплекса противоэпидемических мероприятий и диагностики лихорадки Эбола на территории Гвинейской Республики был награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени.

Совместные исследования и комплексные программы ПСПбГМУ Павлова продолжались и в последующие годы. В 2015 г. на руководство СЗО Центром СПИД был приглашен Николай Алексеевич Беляков — доктор медицинских наук (1985), профессор (1989), заслуженный деятель науки РФ (1998), действительный член РАН. В состав коллектива Центра также вош-

ли профессора: д.м.н. Вадим Владимирович Рассохин и д.м.н. Елена Борисовна Ястребова. Традиционную тематику Центра дополнили изучением коморбидных состояний при ВИЧ-инфекции в СЗФО Российской Федерации [3].

Существование кафедры социально значимых инфекций и фтизиопульмонологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, широкое сотрудничество с медицинскими учреждениями Северо-Запада и других регионов, с ведущими университетами и институтами, участие в больших международных проектах позволяют Центру соответствовать требованиям времени.

Совместно с Институтом экспериментальной медицины, Институтом мозга человека, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Санкт-Петербургским научно-исследовательским психоневрологическим институтом им. В.М. Бехтерева, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова были реализованы многие научно-исследовательские программы. ФБУН НИИЭМ имени Пастера стал одним из соучредителей журнала «ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии». Регулярно издаются аналитические обзоры, монографии и руководства для врачей, включающие материалы исследований последних лет (рис. 5).

Северо-Западный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД в составе ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» представлен несколькими структурными подразделениями: лабораторей иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, отделением диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний, отделением эпидемиологии и профилактики ВИЧ-инфекции, отделение хронической вирусной инфекции, где работают четыре доктора и три кандидата медицинских наук, пять высококвалифицированных врачей с высшей и первой квалификационной категорией.

**Рисунок 4. Руководители Центра разных лет: профессор Д.А. Лиознов (справа) и академик РАН Н.А. Беляков, 2018 г.**

Figure 4. The AIDS Center headed over the years by: Professor D.A. Lioznov (on the right) and Academician of the Russian Academy of Sciences N.A. Belyakov, 2018

Комплексные исследования Центра с Университетами и научно-исследовательскими институтами позволили провести весьма значимые для науки и практики исследования в области эпидемиологии и клиники различных вирусных инфекций и коморбидных состояний, которые


**Рисунок 5. Обложки монографий последних лет, подготовленных сотрудниками Центра СПИД**

Figure 5. Recent monograph covers prepared by the staff of the AIDS Cente


**Рисунок 6. Школа-семинар «Избранные вопросы хронических вирусных инфекций в клинической практике» проведен сотрудниками Центра 26 февраля 2020 г. в Санкт-Петербурге, д.м.н. В.В. Рассохин, д.м.н. Е.Б. Ястребова, к.м.н. Е.В. Боева**

Figure 6. The school-seminar «Select issues of chronic viral infections in clinical practice» was held in St. Petersburg on February 26, 2020, by the AIDS Center staff members DSc (Medicine) V.V. Rassokhin, DSc (Medicine) E.B. Yastrebova, PhD (Medicine) E.V. Boeva

были обобщены в ряде монографий, журнальных статей и доложены на конференциях международного и регионального уровня (рис. 6) [1, 2, 4, 5].

В последнее десятилетие Центр — это творческая лаборатория для подготовки врачей высшей квалификации. На базе Центра с участием или под руководством его сотрудников выполнены 5 докторских и 16 кандидатских диссертаций. Соискателями ученых степеней и участниками исследований являются врачи и научные работники различных организаций из СЗФО и других регионов страны. За комплекс проводимых работ в 2021 г. сотрудники Центра стали лауреатами Премии Правительства Санкт-Петербурга в области науки и образования.

**Список основных монографий за 15 лет, в процессе подготовки которых принимали участие члены творческого коллектива Северо-Западного Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями СПб НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера:**

– «Вирус иммунодефицита человека — медицина» (СПб., 2010, 2011, 2012);
– «Женщина, ребенок и ВИЧ» (СПб., 2012);
– «ВИЧ — медико-социальная помощь» (СПб., 2011);
– «Радиология и ВИЧ-инфекция» (СПб., 2017, 2018);
– «Коморбидные состояния при ВИЧ-инфекции», 1–3 (СПб., 2018–2020);
– «Персонализированная ВИЧ-медицина» (СПб., 2020);
– «ВИЧ-инфекция и коморбидные состояния» (СПб., 2020);
– «COVID-19. Начало эпидемии» (СПб., 2020);
– «Эволюция пандемии COVID-19» (СПб., 2021);
– «Последствия пандемии COVID-19» (СПб., 2022) [5];
– «Новая коронавирусная инфекция COVID-19 у женщин и детей» (СПб., 2022) [4];
– «Антиретровирусная терапия у детей с ВИЧ-инфекцией» (СПб., 2023);
– «По следам мировых эпидемий» (СПб., 2022);
– «Биоценоз человека и госпитальная среда» (СПб., 2023) (рис. 7).

**Подготовленные диссертации:**

**Докторские**:
– Рассохин В.В. — Соматические и вторичные заболевания у больных на фоне ВИЧ-обусловленной иммуносупрессии (2014 г.);
– Сизова Н.В. — Особенности антиретровирусной терапии и эволюция лекарственной устойчивости ВИЧ у больных в условиях мегаполиса (2014 г.);
– Самарина А.В. — Стратегия ограничения распространения ВИЧ-инфекции у женщин репродуктивного возраста и риска перинатального заражения (2014 г.);
– Леонова О.Н. — Тяжелые и коморбидные формы ВИЧ-инфекции: клиника, эпидемиология, организация медико-социальной помощи (2019 г.);
– Азовцева О.В. — Коинфекция: ВИЧ-инфекция, туберкулез, хронический вирусный гепатит (2021 г.).

**Кандидатские:**
– Левина О.С. — Социально-психологические детерминанты приверженности к лечению и минимизации риска распространения ВИЧ-инфекции (2013 г.);

– Федоров П.Н. — Алгоритм диагностики состояний печени с использованием ультразвуковой эластографии и индекса FIB-4 у ВИЧ-инфицированных больных с хроническим гепатитом С (2015 г.);
– Мартиросян М.М. — Заболевания шейки матки, ассоциированные с вирусом папилломы человека, у ВИЧ-инфицированных женщин в Санкт-Петербурге (2015 г.);
– Магонов Е.П. — Комплексная магнитно-резонансная морфометрия очаговых и атрофических изменений головного мозга (на примере рассеянного склероза и ранних стадий ВИЧ-инфекции) (2015 г.);
– Маковская Н.И. — Воспалительные заболевания слизистых оболочек полости рта и челюстно–лицевой области у ВИЧ-инфицированных больных (2015 г.);
– Гайсина А.В. — Патофизиологические механизмы формирования ВИЧ-ассоциированных нейрокогнитивных расстройств (2016 г.);
– Громова Е.А. — Метаболические изменения в головном мозге у ВИЧ-инфицированных пациентов по данным позитронно-эмиссионной томографии с 2–18F-фтордезокси-D-глюкозой и протонной магнитно-резонасной спектроскопии (2017 г.);
– Сафонова П.В. — Социально-психологические факторы рискованного поведения ВИЧ-инфицированных женщин и их выявление для сдерживания эпидемии ВИЧ-инфекции (2017 г.);
– Шеломов А.С. — Клиническая, иммунологическая, вирусологическая характеристика поражений центральной нервной системы при ВИЧ-инфекции (2019 г.);
– Огурцова С.В. — Характеристика, особенности и эволюция эпидемического процесса ВИЧ-инфекции на территориях Северо-Запада России (2019 г);
– Гутова Л.В. — Клинико-иммунологическая характеристика женщин репродуктивного возраста на фоне лечения коинфекции ВИЧ и ХГС (2019 г.);
– Боева Е.В. — Клинические и психосоциальные особенности женщин репродуктивного возраста с сочетанной инфекцией ВИЧ/ВГС (2021 г.);
– Бакулина Е.Г. — Клинико-лучевые сопоставления при поражениях головного мозга у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне антиретровирусной терапии (2021 г.);
– Гордон Е.О. — Нежелательные явления на фоне антиретровирусной терапии у детей с ВИЧ-инфекцией (2022 г.);
– Некрасова А.В. — Клинико-морфологическая характеристика, результаты лечения и прогноз злокачественных новообразований при ВИЧ-инфекции (2022 г.);
– Чирская М.А. — Сочетанная инфекция ВИЧ и сифилис: особенности течения, диспансеризации и оказания комплексной специализированной помощи (2023 г.).


**Рисунок 7. Монография юбилейного года «Биоценоз человека и госпитальная среда» Под ред. Н.А. Белякова и С.Ф. Багненко, СПб; 2023, 424 с.**

Figure 7. A Jubilee Year Monograph «Human biocenosis and hospital environment» Edited by N.A. Belyakov and S.F. Bagnenko, St. Petersburg, 2023, 424 p.

**Традиционные ежегодные конференции, проводимые сотрудниками Центра:**

– «ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии» (2009–2023 гг.);
– «Фармакоэкономика вирусных инфекций» (2013–2023 гг.);
– «Эпидемиология вирусных инфекций на Северо-Западе Европы» (2016–2022 гг.);
– «Поражение центральной нервной системы при вирусных инфекциях» (2011–2023 гг.).

## Список литературы/References

1. Биоценоз человека и госпитальная среда / Под ред. Н.А. Белякова, С.Ф. Багненко. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2023. 424 с. [Human biocenosis and hospital environment. Eds N.A. Belyakov, S.F. Bagnenko. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2023. 424 p. (In Russ.)*]
2. ВИЧ-инфекция и коморбидные состояния в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации в 2021 году: аналитический обзор / Под ред. Н.А. Белякова. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2023. 48 с. [HIV infection and comorbid conditions in the North-Western Federal District of the Russian Federation in 2021: an analytical review. Ed. by N.A. Belyakov. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2023. 48 p. (In Russ.)*]
3. ВИЧ-инфекция и коморбидные состояния. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2020. 680 с. [HIV infection and comorbid conditions. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2020. 680 p. (In Russ.)*]

4. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 у женщин и детей: учебное пособие / Под ред. Н.А. Белякова. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2022. 110 с. [New coronavirus infection COVID-19 in women and children: textbook. Ed. by N.A. Belyakov. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2022. 110 p. (In Russ.)*]
5. Последствия пандемии COVID-19 / Под ред. Н.А. Белякова, С.Ф. Багненко. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2022. 464 с. [Consequences of the COVID-19 pandemic. Eds N.A. Belyakov, S.F. Bagnenko. *St. Petersburg: Baltic Medical Educational Center, 2022. 464 p. (In Russ.)*]
6. Чурина М.А., Бледных Н.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Мутации лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ в Архангельске // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016. Т. 8, № 4. С. 93–94. [Churina M.A., Blednykh N.A., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolyan A.A. Mutations of HIV-1 drug resistance in patients with virological inefficiency of ART in Arkhangelsk. *VICh-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders, 2016, vol. 8, no. 4, pp. 93–94. (In Russ.)*]
7. Чурина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Никитина Н.А., Росоловский А.П., Гребенкина Е.В., Ткаченко Т.Н., Жандармова Т.А., Трофимова Т.С., Асадуллаев М.Р., Беляков Н.А., Тотолян А.А. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1. С. 82–92. [Churina M.A., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Nikitina N.A., Rosolovsky A.P., Grebyonkina E.V., Tkachenko T.N., Zhandarmova T.A., Trofimova T.S., Asadullayev M.R., Belyakov N.A., Totolian A.A. HIV-1 drug-resistance and molecular epidemiology in patients with ART failure in Veliky Novgorod. *VICh-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 82–92. (In Russ.)*] *doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-82-92*
8. Smol'skaia T.T. Khodakevich L.N., Kobyshcha I.V., Pimenov A.S.1, Ostrovskiĭ D.V., Shilova E.A., Suvorova S.V., Kotova S.V., Terent'eva Z.V., Volkova G.V., Makarenko G.A. An HIV prevalence study by means of sentinel epidemiological surveillance among injection narcotic abusers in Saint Petersburg. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology, 2000, no. 4, pp. 31–33.*

**Авторы:**

**Беляков Н.А.**, д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой социально значимых инфекций ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; главный научный сотрудник ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; руководитель Северо-Западного Окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Огурцова С.В.**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, врач-эпидемиолог отделения эпидемиологии и профилактики ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Рассохин В.В.**, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры социально значимых инфекций и фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Лиознов Д.А.**, д.м.н., зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; директор ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Ястребова Е.В.**, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры социально значимых инфекций и фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Боева Е.В.**, к.м.н., ассистент кафедры социально значимых инфекций и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; врач-инфекционист, зав. отделением хронической вирусной инфекции Северо-Западного Окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

**Authors:**

**Belyakov N.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Head of the Department of Socially Significant Infections, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Chief Researcher of the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Head of North-West District Center for Prevention and Control of AIDS, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Ogurtsova S.V.**, PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, Epidemiologist of the Department of Epidemiology and Prevention of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Rassokhin V.V.**, DSc (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Socially Significant Infections and Phthisiopulmonology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Lioznov D.A.**, DSc (Medicine), Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Director of Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Yastrebova E.V.**, DSc (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Socially Significant Infections and Phthisiopulmonology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Boeva E.V.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Socially Significant Infections and Phthisiopulmonology, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Infectious Disease Doctor, Head of Department of Chronic Viral Infection in North-West District Center for Prevention and Control of AIDS, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Поступила в редакцию 19.07.2023
Принята к печати 13.08.2023

Received 19.07.2023
Accepted 13.08.2023

# 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



# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

**Иллюстрации к статье «Разработка структуры и штамма-продуцента *E. coli* для антигена, содержащего последовательности белков N, S, M, E коронавируса SARS-CoV-2» (авторы: В.В. Копать, А.А. Рябченкова, Е.Л. Чирак, Е.Р. Чирак, А.И. Саенко, Н.Н. Колмаков, А.С. Симбирцев, И.В. Духовлинов, А.А. Тотолян) (с. 653–662)**

Illustrations for the article "Designing structure and *E. coli* strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, M, E protein-related sequence antigen" (authors: Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A.) (pp. 653–662)

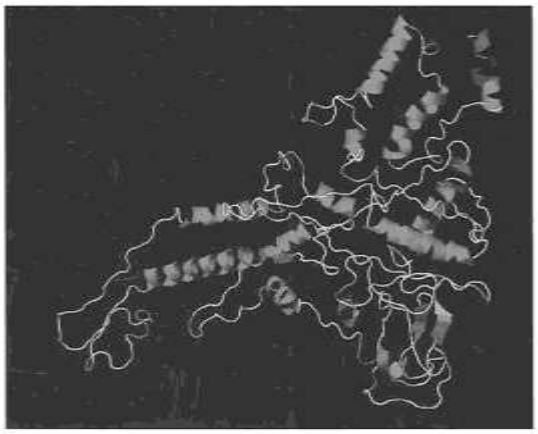

**Рисунок 2. Смоделированная структура антигена коронавирусного рекомбинантного (3D модель белка), визуализированная с помощью I-TASSER [31]**

Figure 2. Modeled structure of the recombinant coronavirus antigen (3D protein model) rendered with I-TASSER [31]

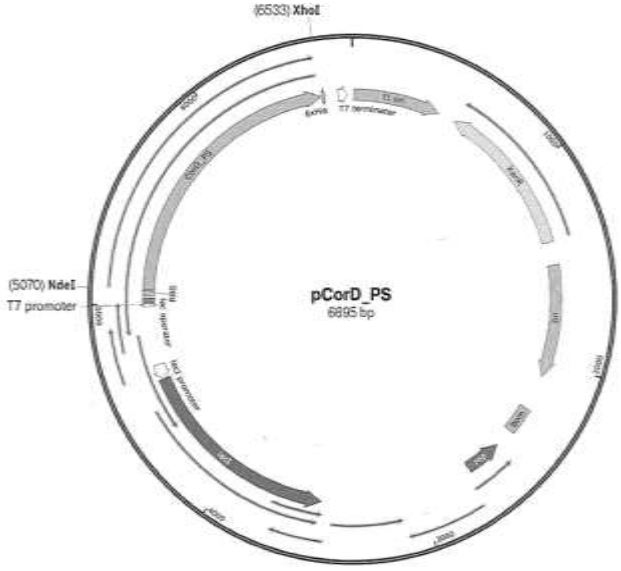


**Рисунок 3. Схематическое изображение конструкции рекомбинантного вектора pCorD_PS**

Figure 3. Schematic representation of the pCorD_PS recombinant vector construct

**Примечание.** Модифицированная версия pET-24a (+), в которой последовательность, кодирующая коронавирусный антиген, клонирована по сайтам NdeI/XhoI.

Note. Modified version of pET-24a (+) in which the coronavirus antigen coding sequence is cloned at the NdeI/XhoI sites.

**Иллюстрации к статье «Многофакторное влияние на респираторную заболеваемость у людей репродуктивного возраста и эффективность одорантов с натоферином и андроферином в отношении неспецифической резистентности слизистой оболочки носа и снижения частоты респираторных инфекций» (авторы: А.В. Бедарева, Е.В. Шабалдина, Е.А. Астафьева, А.А. Чуянова, А.В. Шабалдин) (с. 723–734)**

Illustrations for the article "A multifactorial impact on respiratory morbidity in people of reproductive age and effectiveness of natopherine- and andropherine-containing odorants regarding a non-specific resistance of the nasal mucosa and lowered morbidity of respiratory infections" (authors: Bedareva A.V., Shabaldina E.V., Astafieva E.A., Chuyanova A.A., Shabaldin A.V.) (pp. 723–734)

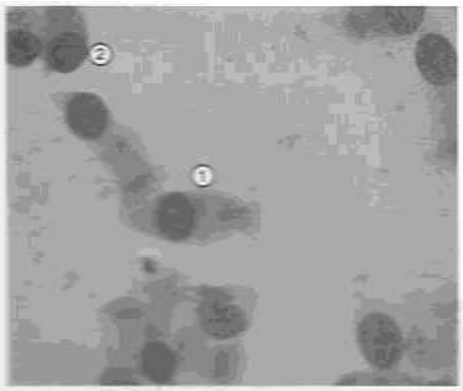


**Рисунок 1. Щеточная микробиопсия слизистой оболочки носа. Нормальные проявления клеточных реакций на слизистой оболочки носа. Клетки функционального эпителия (1), клетки плоского эпителия (2)**

Figure 1. Brush microbiopsy of the nasal mucosa. Normal manifestations of cellular reactions on the nasal mucosa. Functional epithelial cells (1), squamous epithelial cells (2)

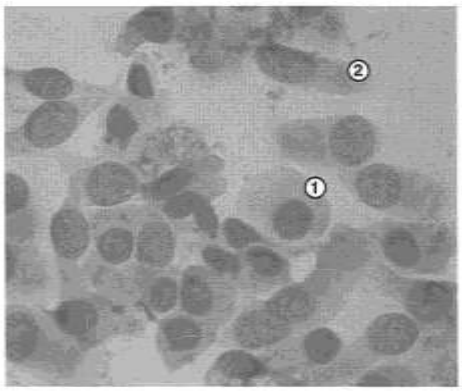


**Рисунок 2. Щеточная микробиопсия слизистой оболочки носа. Высокие клеточные реакции на слизистой оболочке носа, доминируют клетки плоского эпителия (1). Единичный функциональный цилиндрический мерцательный эпителий (2)**

Figure 2. Brush microbiopsy of the nasal mucosa. High cellular responses to the nasal mucosa, dominated by squamous epithelium cells (1). Single functional cylindrical ciliated epithelium (2)