

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 В ГРУППЕ РИСКА «МЕДИЦИНСКИЕ РАБОТНИКИ»



И.Д. Решетникова^{1,3}, Ю.А. Тюрин^{1,2}, И.Г. Мустафин², Е.В. Агафонова¹, Н.Д. Шайхразиева⁴

¹ ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

² ФГАОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Казань, Россия

³ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет Минобрнауки России, г. Казань, Россия

⁴ Казанская государственная медицинская академия — филиал ГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, г. Казань, Россия

Резюме. Актуальность. Изучение особенностей врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа у медицинских работников, которые являются наиболее уязвимой социальной группой с высоким риском инфицирования, является актуальной задачей исследований. Цель исследования: комплексное изучение врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа и анализ связей между клинически значимыми полиморфизмами (SNP) в генах TLR2, TLR4, уровнем экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови, цитокиновым профилем периферической крови (IL-1 β , IL-10, IL-6, IFN γ , маркер активации тромбоцитов) и специфическим гуморальным иммунным ответом на SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя в ранние и поздние сроки реконвалесценции после COVID-19. *Материалы и методы.* В работе применены иммунологические, цитофлуориметрические и молекулярно-генетические методы исследования. *Результаты.* В ранний период реконвалесценции после COVID-19 у МР наблюдается увеличение экспрессии TLR2 рецептора на моноцитах, средняя интенсивность флуоресценции была достоверно выше в 1,5 раза, чем в группе контроля. В поздний период реконвалесценции, через 7 месяцев после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 было отмечено снижение сыровоточного уровня IFN γ . Депрессия синтеза IFN γ была значительной, его концентрация у МР снизилась в этот период в 82 раза, что было достоверно ниже по сравнению с группой контроля (в 59 раз). Выявлен дисбаланс цитокинов, контролирующих противовирусный врожденный и адаптивный иммунный ответ, у МР с установленной комбинацией полиморфизмов rs5743708 и rs4986790 в генах TLR2, TLR4 с частотой встречаемости не более 6,7%. Установлено, что через 7 месяцев после инфицирования новой коронавирусной инфекцией COVID-19, наблюдается заметное уменьшение уровня IFN γ , IL-1 β и IL-10. Исследования свидетельствуют о нарушениях как врожденных, так и адаптивных механизмов иммунного ответа и необходимости оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, направленных на повышение неспецифической резистентности, защиты барьеров слизистых респираторного тракта и выявление генетических предикторов дефектов врожденного и адаптивного иммунного ответа у медицинских работников- реконвалесцентов COVID-19.

Ключевые слова: медицинские работники, цитокины, SARS-CoV-2, TLR-2- и TLR4-рецепторы.

Адрес для переписки:

Тюрин Юрий Александрович
420015, Россия, г. Казань, ул. Б. Красная, 67,
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет.
Тел.: 8 (843) 236-67-81.
E-mail: kniem@mail.ru

Contacts:

Yuri A. Tyurin
420015, Russian Federation, Kazan, Bolshaya Krasnaya str., 67,
Kazan Federal University.
Phone: +7 (843) 236-67-81.
E-mail: kniem@mail.ru

Для цитирования:

Решетникова И.Д., Тюрин Ю.А., Мустафин И.Г., Агафонова Е.В., Шайхразиева Н.Д. Изучение молекулярно-генетических и иммунологических предикторов течения COVID-19 в группе риска «медицинские работники» // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 289–298. doi: 10.15789/2220-7619-AMG-10359

Citation:

Reshetnikova I.D., Tyurin Yu.A., Mustafin I.G., Agafonova E.V., Shaikhrazieva N.D. Assessing molecular genetic and immunological predictors of COVID-19 course in healthcare worker risk group // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 289–298. doi: 10.15789/2220-7619-AMG-10359

ASSESSING MOLECULAR GENETIC AND IMMUNOLOGICAL PREDICTORS OF COVID-19 COURSE IN HEALTHCARE WORKER RISK GROUP

Reshetnikova I.D.^{a,c}, Tyurin Yu.A.^{a,b}, Mustafin I.G.^b, Agafonova E.V.^a, Shaikhrazieva N.D.^d

^a Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation

^b Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

^c Kazan (Volga Region) Federal University, Ministry of Education of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

^d Kazan State Medical Academy — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation

Abstract. Relevance. Studying features of innate and adaptive mechanisms of immune response in medical workers (MW), the most vulnerable social group with a high risk of infection, is an urgent research task. The aim of the study: Comprehensive study of innate and adaptive immune mechanisms and analyzing relationships between clinically significant polymorphisms (SNPs) in TLR2, TLR4 genes, TLR2 expression level on peripheral blood monocytes, peripheral blood cytokine profile (IL-1 β , IL-10, IL-6, IFN γ , platelet activation marker) and SARS-CoV-2-specific humoral immune response in medical workers (MW) at a temporary infectious disease hospital in early and late COVID-19 convalescence. *Materials and methods.* immunologic, cytofluorimetric and molecular-genetic research methods were applied. Adaptive immune response in medical workers — COVID-19 convalescent subjects. *Results.* Early post-COVID-19 convalescence period in MW was linked to higher TLR2 monocyte expression; the mean fluorescence intensity was significantly elevated by 1.5-fold compared to control group. Late convalescence period (7 months post-COVID-19) was characterized by lowered serum IFN γ level. A decline in IFN γ production was significant: decreased by 82-fold in MR that was markedly stronger compared to control group (59 times). The imbalance of cytokines controlling antiviral innate and adaptive immune response was revealed in MW with identified combination of polymorphisms rs5743708 and rs4986790 in TLR2, TLR4 genes with the rate not exceeding 6.7%. It was found that 7 months after COVID-19 there was a markedly decreased IFN γ , IL-1 β and IL-10 levels. The studies indicate both altered innate and adaptive immune mechanisms and a need to optimize therapeutic and prophylactic measures aimed at increasing patient-intrinsic resistance, protection of respiratory tract mucosal barriers and identification of genetic predictors of defects in innate and adaptive immune response in medical workers — COVID-19 convalescent subjects.

Key words: medical workers, cytokines, SARS-CoV-2, TLR-2 and TLR4-receptors.

Введение

С начала эпидемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 в январе–марте 2020 г. в Китае, а в последующем — в Европе и Северной Америке, сообщается о случаях внутрибольничного инфицирования SARS-CoV-2, в том числе и среди медицинских работников (МР) [3]. Комплексное изучение особенностей врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа у МР, которые являются наиболее уязвимой социальной группой с высоким риском инфицирования, является актуальной задачей исследований.

Состояние иммунной системы и наличие генетически обусловленных иммунологических аномалий, которые затрагивают субпопуляции эффекторных Т- и В-клеток, метаболические пути, связанные с окислительным фосфорилированием, генерацией активных форм кислорода, мутации в ключевых рецепторах, контролирующих общие механизмы врожденного и адаптивного иммунного ответа, оказывают непосредственное влияние на особенности патогенеза и клиническое течение коронавирусной инфекции нового типа в различные периоды заболевания (острый и реконвалесценция — стадия «иммунологического восстановления» после COVID-19), а также на прогноз для паци-

ентов, перенесших эту инфекцию. Существует предположение о том, что эти аномалии могут способствовать формированию пост-COVID-19-синдрома, однако прямых доказательств на данный момент не имеется [14, 15].

Следует отметить, что система макрофагов, являющаяся частью иммунной системы человека, способна выявлять вирусы непосредственно через Толл-подобные рецепторы (TLR), а также через образование комплексов с Fc-рецепторами. Распознавание иммунных комплексов с Fc-рецепторами и TLR инициирует активацию макрофагов и высвобождение эффекторных молекул — цитокинов широкого спектра действия, которые способствуют элиминации вируса. Быстрый клиренс иммунных комплексов критически важен для поддержания иммунного гомеостаза и разрешения воспаления. У восприимчивых людей наблюдается значительная функциональная гетерогенность сигнальной оси Fc-рецептора, а также выраженная генетическая гетерогенность генотипов TLR из-за наличия однонуклеотидных замен (SNP) в генах этих рецепторов. Группа TLR широко представлена и экспрессируется на различных клеточных типах, включая дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и эпителиальные клетки. Недавние исследования показали влияние специфической модификации доменов

Fc-рецепторов, которая характеризуется отсутствием основного остатка фукозы (афукозилирование), на развитие тяжелого течения COVID-19 у пациентов и на прогрессирование симптомов у тех, у кого инфекция сначала имела легкое течение [8]. Согласно проведенным исследованиям, у лиц с клинически значимыми полиморфизмами генов, кодирующих TLR, наблюдается прямая связь между течением бактериальных и вирусных инфекций и возникновением сепсиса. В результате иммунного дисрегуляторного ответа возможно развитие длительных пост-COVID симптомов, связанных с формированием аутоиммунного ответа, направленного против собственных тканевых антигенов, который сохраняется после элиминации вируса и сопровождается тканевым повреждением. TLR — является наиболее исследуемым семейством рецепторов распознавания образов (PRR), основной функцией которых является выявление консервативных структур на микроорганизмах. Они играют важную роль в активации врожденной иммунной системы при распознавании вирусных частиц [12, 16]. Активация TLR приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1, IL-6 и TNF α , вместе с IFN γ . Когда лиганд связывается с TLR, происходит олигомеризация, гомодимеризация или гетеродимеризация рецептора посредством PAMP-TLR взаимодействия, что инициирует передачу сигнала внутри клетки. Среди всех TLR млекопитающих, TLR2 проявляет наибольшую способность распознавания PAMP наиболее широкого спектра возбудителей, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, микобактерии, грибки, а также вирусы. Этот феномен в основном обусловлен способностью TLR2 гетеродимеризоваться либо с TLR1, либо с TLR6 [7]. Отметим, что TLR2 играет решающую роль в распознавании грамположительных бактерий и микобактерий, что имеет особое клиническое значение. В настоящее время, грамположительные бактерии являются наиболее распространенной причиной серьезных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и дисфункцией органов, в том числе, при развитии септического шока в отделениях интенсивной терапии. Это особенно актуально в лечении пациентов с COVID-19 во временных инфекционных госпиталях, где предоставляется специализированная медицинская помощь.

Генетические мутации в генах, кодирующих TLR, в форме SNP, представляют собой различные вариации последовательности ДНК, возникающие при изменении одного нуклеотида в геномном коде. Одна из групп SNP, известных как синонимичные полиморфизмы, не приводят к изменению аминокислот в белке рецептора, поскольку генетический код имеет избыточность. В то время как другая группа, несинонимичные

SNP, может изменить аминокислоту, что существенно влияет на структуру или функцию белка рецептора. Особенный интерес представляет полиморфный вариант SNP TLR2 (rs5743708), который состоит из замены G > A в нуклеотиде 2251, что приводит к замене Arg753 на Gln (Arg753Gln). Этот SNP находится в области высококонсервативного участка белка рецептора TLR2 и ассоциируется с возникновением осложнений при сепсисе [13, 20]. Еще одним важным TLR и активационным функциональным каскадом иммунных реакций, имеющим существенное значение для патогенеза COVID-19, является TLR4 [19]. Стоит отметить, что TLR4 экспрессируется главным образом на клетках иммунной системы, таких как макрофаги, дендритные клетки и моноциты, а также на резидентных клетках легочной ткани и миокарда. В легких экспрессия TLR4 отмечается на низком базальном уровне в альвеолярных клетках, включая легочные макрофаги типа I и II, и в клетках бронхиального эпителия. Интересно, что экспрессия TLR4 и сенсибилизация к липополисахаридам резко возрастает при воспалительных процессах, инфильтрации легких макрофагами. Оказалось, что SNP (rs4986790) TLR4, который характеризуется заменой 1063A > G, и приводит к замещению аспарагиновой кислоты глицином в первичной структуре белкового рецептора (Asp299Gly), связан с высокой восприимчивостью к респираторно-синцитиальному вирусу (RSV), который обладает тропизмом к легочной ткани [10]. Последние исследования по моделированию «шиповидного гликопротеина» — гликопротеина белковой оболочки коронавируса SARS-CoV-2 *in silico* позволяют сделать вывод, что данный гликопротеин имеет наиболее сильное белок-белковое взаимодействие с TLR4. Этот факт, вероятно, подтверждает роль TLR4 в инфекционном процессе при новой коронавирусной инфекции COVID-19 у человека [4, 11].

На основании вышеизложенных теоретических предпосылок, цель исследования состояла в комплексном изучении врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа путем анализа связей между клеточными и генетическими аспектами иммунитета, такими как известные клинически значимые полиморфизмы (SNP) в генах TLR2, TLR4, контролирующими иммунный ответ, уровнем экспрессии TLR2, на моноцитах периферической крови, цитокиновым профилем периферической крови (IL-1 β , IL-10, IFN γ , IL-6) и маркера активации тромбоцитов (sCD40L) и специфическим гуморальным иммунным ответом на SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя (ВИГ), которые являются группой высокого риска инфицирования, в ранние и поздние сроки реконвалесценции после COVID-19.

Материалы и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора (протокол № 1 от 17.06.2020). Исследование проведено с июня 2020 г. по июль 2021 г. После подписания информированного согласия в исследование были включены 68 невакцинированных серопозитивных к SARS-CoV-2 МР ВИГ, переболевших новой коронавирусной инфекцией по данным регистра больных, имеющих лабораторное подтверждение (U07.1), или с диагнозом, установленным по данным компьютерной томографии (U07.2), и не имеющих документального подтверждения факта перенесенного заболевания, в том числе ОРВИ в осень—весну 2020 г. Информация, собранная в исследовании, включала: паспортные данные, место работы; должность; клиническо-лабораторные данные (наличие симптомов ОРЗ в осень—весну 2020 г., результаты ПЦР на SARS-CoV-2, подтвержденный диагноз «COVID-19» (при наличии), дата появления симптомов ОРЗ, анализы на COVID-19 (ПЦР или ИФА); наличие хронических заболеваний; эпидемиологический анамнез (предполагаемое место заражения COVID-19, контакты с больными COVID-19 в семье или на работе, выезд из страны или в другие регионы РФ за последние 3 мес.).

Среди 68 участников исследования было 18 мужчин (26,5%) и 50 женщин (73,5%) в возрасте от 18 до 72 лет, средний возраст составил $43,5 \pm 1,51$ лет. Врачей было 36 (52,9%), 25 (36,8%) — среднего медицинского персонала и 7 (10,3%) — младшего персонала. У 69,1% (47 человек) отмечались в анамнезе клинические проявления COVID-19, среди них перенесли инфекцию в легкой форме 29 человек (42,7%), в среднетяжелой — 14 (20,6%), тяжелой — 4 (5,9%) и бессимптомно — 21 (30,9%).

В контрольную группу (15 человек) включали лиц не болевших COVID-19 и с отсутствием полиморфных аллелей SNP TLR2 (rs5743708) и TLR4 (rs4986790) в генотипе.

Группа сравнения больные COVID-19 госпитализированные в ВИГ с тяжелым и среднетяжелым течением COVID-19 (31 пациент), которым было проведено комплексное изучение показателей иммунного ответа и маркера активации тромбоцитов (сывороточных концентраций sCD40L, IL-1 β , IL-10, IFN γ , изучение интенсивности экспрессии TLR2 рецепторов на моноцитах периферической крови и детекций SNP TOLL -2 и 4 в геномной ДНК, фенотипирование субпопуляций лимфоцитов периферической крови).

Определение цитокинов в сыворотке крови (IL-1 β , IL-10, IFN γ , IL-6) пациентов и лиц контрольной группы проводили иммунофер-

ментным методом с помощью набора реагентов (Вектор-Бест, Россия) проводили дважды через месяц после появления первых симптомов и через 6 месяцев.

Уровень sCD40L определяли иммуноферментным методом с применением набора реагентов ZyQuik™ sCD40L ELISA Kit (Invitrogen Corporation, США) включающего мышинные моноклональные антитела к sCD40L человека. Коэффициент вариации в контрольных материалах не превышал 5,5%.

Изучение экспрессии TLR2 на мононуклеарах ПК проводили методом проточной цитофлуориметрии. Образец цельной крови 100,0 мкл инкубировали с 5,0 мкл МАТ в течение 10 минут, затем вносили лизирующий эритроциты раствор (Erythrocyte-Lysing Reagent), после чего клетки отмывали раствором Хенкса центрифугированием при 1000 об/мин. Экспрессию рецепторов на клетках (МПК) определяли методом проточной цитофлуориметрии. В каждом образце анализировали не менее 150 000 событий. Для цитофлуориметрического разделения МПК на лимфоциты, моноциты и нейтрофилы, экспрессирующих TLR 2 типа, использовали следующие моноклональные антитела: анти-CD14, меченные APC (e-BioScience), анти-CD 282 (TLR2) меченные Alexa Fluor 488 (e-BioScience).

Определяли процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TLR2, а также среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) этих рецепторов на моноцитах. Показатель СИФ — пропорционален экспрессии рецепторов на клеточной мембране.

Мониторинг содержания антител (АТ) IgM и IgG к SARS-CoV-2 осуществлялся ежемесячно с июля 2020 г. методом двухстадийного прямого твердофазного ИФА. Определение IgG к SARS-CoV-2 проводилось с использованием отечественных диагностических тест-систем с сорбированным в лунках планшета рекомбинантным полноразмерным тримеризованным гликопротеином (Spike-белок) вируса SARS-CoV-2 («SARSCoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Россия). Для детекции IgM к SARS-CoV-2 использовали отечественные тест-системы с иммобилизованными в лунках антителами к IgM человека и выявлением специфических АТ с помощью конъюгатов, содержащих антигены вируса — N-белок нуклеокапсида («SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Россия). Результаты исследования выражались в виде коэффициента позитивности (КП), представляющего собой отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности, высчитываемой в каждом анализе. Интерпретация результатов в зависимости от использованной тест-системы

была в следующих пределах: положительными считались образцы с КП, превышающим 1,1–1,2; отрицательными — с КП менее 0,8–0,9. Динамику титров IgM и IgG у каждого МР оценивали по рассчитанной линии тренда среднего геометрического значения титров антител.

Для изучения распространенности SNP TLR2 и TLR4 в исследуемой популяции была сформирована группа из 234 человек, проживающих в г. Казани, которая включала 134 МР ВИГ и консультативной специализированной поликлиники; группу контроля составили 100 лиц, не являющихся медицинскими работниками. Гендерно-возрастная структура участников исследования была однородной (средний возраст составил $45,6 \pm 2,44$ лет, мужчин 21% и женщин 79%).

Скрининг полиморфизмов генов TLR2 и TLR4 у исследуемых индивидуумов проводили методом АС-ПЦР с помощью реагентов «SNP-экспресс» НПФ «Литех» (Москва, Россия). Выделение геномной ДНК человека проводили из образцов буккального эпителия с помощью набора реагентов для экспресс-выделения ДНК из буккального соскоба (НПФ, «Литех», Россия).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и WinPeri (версия 11.65). Были рассчитаны медиана количественных показателей, а также 25-й и 75-персентили признака. Сравнение между группами проводили применяя U-критерий Манна–Уитни, а для характеристика распределения количественных признаков критерий Колмогорова–Смирнова.

Результаты и обсуждение

При изучении цитокинового профиля у группы МР ВИГ, которые были обследованы через месяц после начала симптомов заболевания, отмечается значительное увеличение уровня IFN γ по сравнению с контрольной группой, состоящей из лиц, не инфицированных COVID-19. Кроме того, уровень концентрации IFN γ был значительно выше, чем в группе контроля. Это свидетельствует о сохранении активации макрофагально-моноцитарного звена в ответ на новую коронавирусную инфекцию COVID-19 в период ранней реконвалесценции, как отмечено в табл. 1.

Дополнительно нами было установлено, что концентрация провоспалительного цитокина IL-1 β , который вызывает воспалительную реакцию сосудов и индуцирует синтез белков острой фазы, была статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Одновременно мы отметили увеличение уровня IL-10, который способствует дифференци-

ровке В-лимфоцитов, пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов и уменьшению синтеза Th1-цитокинов. Примечательно, что наши исследования показали, что уровень концентрации IL-6 у МР оставался в норме в течение 7 месяцев и не отличался статистически значимо от контрольной группы.

Наше исследование выявило, что в раннем периоде реконвалесценции COVID-19 у МР наблюдается увеличение концентрации sCD40L. Это свидетельствует об активации системы тромбообразования и воспаления. Кроме того, показано, что белок CD40L и его рецептор CD40 экспрессируются различными типами клеток крови и стенки сосудов, включая эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, моноциты/макрофаги и Т-лимфоциты. [6]. Исследования подтверждают, что система CD40/CD40L играет значимую роль в активации как тромбоцитов, так и клеток воспаления и эндотелиоцитов. В периферической крови, CD40L присутствует в виде растворимого фрагмента, известного как sCD40L. Активированные тромбоциты являются основным источником (95%) циркулирующего в крови sCD40L. Поэтому sCD40L считается важным маркером активации тромбоцитов и патологических процессов, связанных с увеличением активности системы тромбообразования [5].

При изучении экспрессии TLR2 нами было установлено, что в ранний период реконвалесценции после COVID-19 у МР наблюдается увеличение экспрессии этого рецептора на моноцитах, средняя интенсивность флюоресценции TLR2 была достоверно выше в 1,5 раза, чем в группе контроля.

В динамике, в поздний период реконвалесценции, через 7 месяцев после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 было отмечено снижение сывороточного уровня IFN γ — основного интерферона второго типа с противовирусным эффектом, который активирует макрофаги и антиген-презентирующие клетки (АПК) и стимулирует переключение классов антител на IgG 2A. При этом депрессия синтеза IFN γ была значительной, его концентрация у МР снизилась в этот период в 82 раза, что было достоверно ниже по сравнению с группой контроля (в 59 раз). Так же с этим коррелировало и снижение концентрации IL-1 β и IL-10, который стимулирует дифференцировку В-лимфоцитов. Необходимо отметить, что в период поздней реконвалесценции активность тромбоцитарного фактора гемостаза sCD40L так же значительно снижалась и была меньше в 2 раза по сравнению с контрольной группой.

При этом экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови не претерпела существенной динамики снижения в этот период.

Таблица 1. Основные показатели экспрессии TLR2 на моноцитах крови и цитокинового профиля сыворотки крови у медицинских работников временного инфекционного госпиталя в период реконвалесценции COVID-19 через 1 и 7 месяцев после появления симптомов

Table 1. Essential TLR2 expression parameters on blood monocytes and serum cytokine profile in medical workers of a temporary infectious hospital during COVID-19 recuperation at 1 and 7 months after the onset of symptoms

Показатель Indicator	Группа/Group			
	MP через месяц от появления симптомов 29.06.2020 г. MW one month after symptoms onset on June 29, 2020 (n = 68)	MP Через 7 месяцев от появления симптомов 19.01.2021 г. MW 7 months after symptoms onset on January 19, 2021 (n = 68)	Больные COVID-19 острый период COVID-19 acute period patients (n = 31)	Контрольная группа Control group (n = 15)
	1	2	3	4
Экспрессия TLR2 на моноцитах ПК/TLR2 expression on peripheral blood (PB) monocytes				
СИФ TLR2 на моноцитах ПК TLR2 MIF on PB monocytes	2500* [2218–3106]	2300* [1578–2578]	н/о	1350 [1400–1560]
Цитокиновый профиль сыворотки/Serum cytokine profile				
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/ml)	327,0* [214,3–367,0]	4,0* [1,7–12,0]	0,0* [0,0–1,0]	237,0 [212,0–267,0]
IL-1β (пг/мл) IL-1 β (pg/ml)	3,1 [2,6–3,7]	1,4 [0,0–2,6]	0,0 [0,0–2,0]	2,36 [2,12–2,5]
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	1,42 [1,28–3,2]	1,4 [1,28–2,4]	38,5* [14,5–63,5]	1,5 [1,5–1,67]
sCD40L (пг/мл) sCD40L (pg/ml)	23,0* [14,9–34,0]	7,8* [2,0–17,0]	34,0* [15,5–106,0]	16,0 [15,0–16,8]
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	5,85 [3,85–9,8]	2,3 [0,6–3,8]	0,12 [0,5–1,3]	4,1 [2,6–3,6]

Таблица 2. Особенности экспрессии TLR2 на моноцитах крови и цитокинового профиля у медицинских работников с выявленными однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) в генах TLR2 и TLR4 (через 1 и 7 месяцев после перенесенного COVID-19)

Table 2. Features of TLR2 expression on blood monocytes and cytokine profile in healthcare workers with identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR2 and TLR4 genes (1 and 7 months after COVID-19)

Показатель Indicator	Группа/Group		
	MP (SNP)* через месяц от появления симптомов 29.06.2020 г. MW (SNP)* one month after symptoms appeared on June 29, 2020 (n = 9)	MP (SNP)* через 7 месяцев от появления симптомов 19.01.2021 г. MW (SNP)* After 7 months from symptom onset on January 19, 2021 (n = 9)	Контрольная группа Control group (n = 15)
	1	2	3
Экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови/TLR2 expression on peripheral blood monocytes			
СИФ TLR2 на моноцитах ПК MIF TLR2 on PB monocytes	3050* [2750–3025]	2578* [1875–2550]	1350 [1400–1560]
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/ml)	216,0* [214,3–350,0]	0,05* [0,02–0,15]	237,0 [212,0–267,0]
IL-1β (пг/мл) IL-1 β (pg/ml)	1,1* [0,6–2,6]	0,02* [0,0–0,1]	2,36 [2,12–2,5]
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	1,5 [1,4–3,4]	1,4 [1,3–2,1]	1,5 [1,5–1,67]
sCD40L (пг/мл) sCD40L (pg/ml)	14,0* [11,9–36,0]	8,7 [6,0–15,0]	16,0 [15,0–16,8]
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	9,8 [7,85–10,8]	2,3 [0,6–3,8]	4,26 [3,6–4,78]

В сравнительном анализе, нами показано, что у пациентов с COVID-19, проходящих лечение в отделении интенсивной терапии, концентрация IFN γ , IL-1 β и IL-10 почти не определялась, в то время как уровень sCD40L был почти в два раза выше нормы (табл. 1). Нами в этом исследовании выявлено, что только у больных COVID-19 в остром периоде, госпитализированных в ВИГ, уровень IL-6 был статистически значимо выше (в 7 раз), по сравнению с исследуемой группой МР.

В дополнение к этому, нами была выделена небольшая группа МР (9 человек) с детектированными в генотипе одновременно двумя SNP, которые затрагивают гены TLR2 и TLR4 с характерным цитокиновым профилем (табл. 2).

Проведенный анализ цитокинового профиля показал, что у группы МР с генотипами, характеризующимися сочетанием SNP в генах TLR2 и TLR4, наблюдалось практически 5000-кратное снижение уровня IFN γ через 7 месяцев после заболевания, а также 118-кратное снижение уровня IL-1 β . Уровень sCD40L тромбоцитарного фактора гемостаза также снижался, но несколько менее значительно (в 1,8 раза ниже нормы).

Нами установлено, что все 9 человек из группы МР, имеющих генотипы, характеризующиеся сочетанием SNP в генах, кодирующих TLR2 и TLR4 перенесли COVID-19 в среднетяжелой форме.

Распределение генотипов SNP в генах TLR2 и TLR4 в исследуемой группе представлено табл. 3.

В группе МР выявили встречаемость полиморфного аллеля А (rs5743708) в гене TLR2 составляющую 4,0% в кододоминантной модели наследования, а полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 — 9,7%. В контрольной группе эти значения для полиморфного аллеля А (rs5743708) в гене TLR2 составили 2,0%, а для полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 — 7,5%. Это свидетельствует о более высокой встречаемости соответствующих SNP TLR в группе МР в сравнении с контрольной группой (ОШ = 2,05 и ОШ = 1,4, $p < 0,05$, соответственно), что подтверждено данными табл. 3.

Таким образом, в исследуемой группе города Казани частота распространения полиморфного аллеля А (rs5743708) в гене TLR2 составила 3,2%, а полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 — 8,76%. Полученные нами результаты по распространенности полиморфного (мутантного) аллеля А (rs5743708, G > A) в гене TLR2, согласуются с данными о частоте распространения этого полиморфного аллеля среди финской и эстонской популяций. Средняя частота полиморфного аллеля А (rs5743708, G > A) в гене TLR2, была 2,96% в финской популяции (исследование FINRISK) и 4,75% среди эстонцев (исследование

«Estonian», включающее 213 человек) [2]. Частота распространения полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 у нашей изученной части популяции была наиболее близка к популяции эстонцев, где эта частота составила 6,7% (исследование, включающее 4480 человек), и финской популяции, где частота распространения этого полиморфного аллеля составила 12,2% (исследование, включающее 304 человека) [1].

Учитывая выявленную депрессию иммунного ответа у МР ВИГ со снижением продукции провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-1 β и IL-10, становится критически важным исследование гуморального специфического иммунного ответа на SARS-CoV-2 в динамике реконвалесценции, включая период, когда концентрация IFN γ снижается. В этот период формирование полноценного адаптивного гуморального противовирусного иммунитета, включая стимуляцию дифференцировки созревания В-лимфоцитов и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов, необходимо для эффективной противовирусной защиты. Для достижения этой задачи требуется проведение динамического мониторинга гумораль-

Таблица 3. Распространенность однонуклеотидных полиморфизмов TLR2 (rs5743708) и TLR4 (rs4986790) среди медицинских работников и контрольной группы лиц, проживающих в г. Казани

Table 3. Prevalence of TLR2 (rs5743708) and TLR4 (rs4986790) single-nucleotide polymorphisms among medical workers and control subjects in the city of Kazan

Генотип Genotype	МР MW	Контрольная группа Control group	ОШ (95%ДИ) OR (95% CI)
rs5743708 TLR2 (G > A)			
GG	126 (94,0%)	97,0 (97,0%)	2,05 (0,5–7,9)
GA	5 (3,7%)	2,0 (2,0%)	
AA	3 (2,2%)	1 (1,0%)	
Аллель G Allele G	96,0%	98,0%	
Аллель A Allele A	4,0%	2,0%	
Всего Total	134	100	234
rs4986790 TLR4 (A > G, T)			
AA	111 (82,8%)	87 (87,0%)	1,4 (0,6–2,9)
AG	20 (15,0%)	11 (11,0%)	
GG	3 (2,2%)	2,0 (2,0%)	
Аллель A Allele A	90,3%	92,5%	
Аллель G Allele G	9,7%	7,5%	
Всего Total	134	100	234

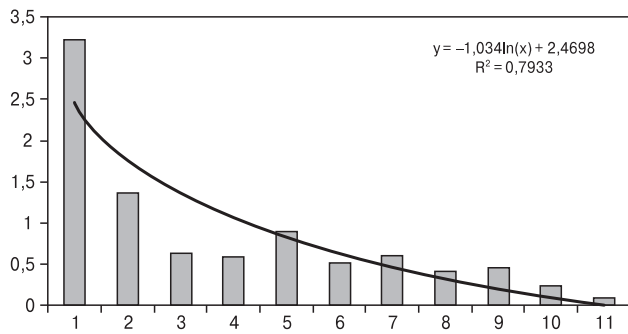


Рисунок 1. Динамика среднегеометрического значения титров IgM к вирусу SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя, начиная от дня с впервые полученным положительным результатом

Figure 1. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgM titer geometric mean value in medical workers of a temporary infectious disease hospital, from first positive result day

ного иммунного ответа в период реконвалесценции, включая выявленный нами критический период [11].

По данным зарубежных исследований, гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2 включает выработку трех видов антител: IgM, IgA и IgG. Формирование IgA начинается на второй день после начала заболевания, достигает своего пика через 2 недели и сохраняется на протяжении длительного периода времени. Для детекции IgM необходимо примерно 7 суток с момента заражения, а пик достигается через неделю после этого [17, 18]. Этот класс антител (IgG) может сохраняться в организме в течение нескольких месяцев и более, и начи-

нает обнаруживаться в крови приблизительно на третьей неделе или ранее после контакта с вирусом SARS-CoV-2 [9].

С начала сероконверсии (положительного результата) у МР ВИГ по титру IgM и IgG к SARS-CoV-2, отмечается уменьшение значений обоих антител (рис. 1 и 2). Наиболее быстрое снижение титра IgM наблюдалось через месяц после сероконверсии, затем снижение происходило более равномерно со среднемесячным уменьшением в размере $-23,56\%$ (рис. 1). Снижение титра IgG было менее интенсивным, со среднемесячным уменьшением на $1,2\%$ (рис. 2).

Из обнаруженных особенностей иммунного ответа можно выделить следующие факты: спустя семь месяцев после выздоровления от COVID-19 у МР отмечается существенное снижение уровней продукции IFN γ , IL-1 β и IL-10. Однако, экспрессия TLR2 на моноцитах и макрофагах остается значительно высокой, что связано с индивидуальными колебаниями уровня специфических IgM и IgG к SARS-CoV-2.

Заключение

В ходе комплексного исследования врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа у невакцинированных МР ВИГ, были обнаружены следующие особенности: через 7 месяцев после инфицирования новой коронавирусной инфекцией COVID-19, наблюдается заметное уменьшение уровня IFN γ , IL-1 β и IL-10. В то же время, уровень активации экспрессии на моноцитах и макрофагах TLR2 сохраняется в значительной степени высоким, что связано с индивидуальной динамикой сокращения уровня специфических IgM и IgG к SARS-CoV-2.

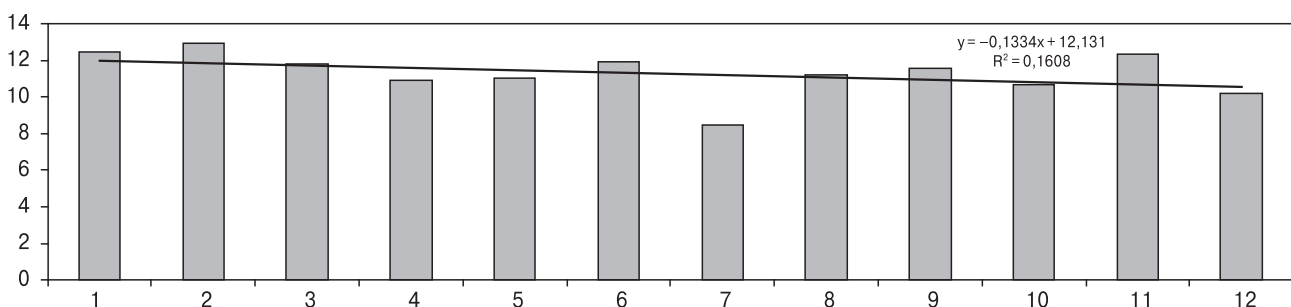


Рисунок 2. Динамика среднегеометрического значения титра IgG к вирусу SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя, начиная от дня с впервые полученным положительным результатом

Figure 2. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgG titer geometric mean value in medical workers of a temporary infectious disease hospital, from first positive result day

Примечание. *Значения статистически значимо различаются по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$; ось ординат — среднегеометрическое значение титров IgG к SARS-CoV-2; по оси абсцисс — порядковый номер точек исследования.

Note. *Values are statistically significantly different compared to the control group, $p < 0.05$; Y-axis — geometric mean value for anti-SARS-CoV-2 IgG titers; X-axis — the serial number of the study points.

В начальный период реконвалесценции после COVID-19 у МР наблюдается повышение экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови. Средняя интенсивность флуоресценции TLR2 достоверно выше в 1,5 раза, чем в группе контроля на протяжении 7 месяцев наблюдения за реконвалесцентами, что указывает на сохранение активности врожденных механизмов иммунной защиты, стимулируемых вирусной и микробной нагрузкой.

В начальные стадии реконвалесценции COVID-19 у МР происходит резкое повышение концентрации sCD40L, что свидетельствует об активации системы тромбообразования и воспаления. Впоследствии, через 7 месяцев, наблюдается значительное снижение уровня данного показателя до значения, которое ниже референсных показателей контрольной группы.

Полученные данные о распространенности полиморфного (мутантного) аллеля A (rs5743708, G > A) в гене TLR2 в изученной когорте МР составляют 4,0%, что соответствует данным о частоте распространенности этого полиморфного аллеля среди финской популяции, где средняя частота полиморфного аллеля A (rs5743708, G > A) составляет до 2,96%.

Распространенность полиморфного аллеля G (rs4986790) в гене TLR4 в изучаемой когорте была сопоставима с эстонской и финской популяциями, где, соответственно, составила 6,7 и 12,2%.

Выявлен дисбаланс цитокинов, контролирующих противовирусный врожденный и адаптивный иммунный ответ, у МР с установленной комбинацией полиморфизмов rs5743708 и rs4986790 в генах TLR2, TLR4 с частотой встречаемости не более 6,7%.

Таким образом, изучение иммунного ответа у невакцинированных МР ВИГ, как группы лиц с высоким риском инфицирования COVID-19, не только в ранние и поздние стадии реконвалесценции, но и в контексте взаимосвязи между известными клинически значимыми полиморфизмами в генах, контролирующими иммунный ответ, и уровнями экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови, цитокиновых профилей периферической крови и маркеров активности тромбоцитов, а также специфического гуморального иммунного ответа на SARS-CoV-2, показало значительные изменения в иммунологических показателях. Эти изменения свидетельствуют о нарушениях как врожденных, так и адаптивных механизмов иммунного ответа и могут снизить устойчивость к респираторным инфекциям. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, направленных на повышение неспецифической резистентности, защиты барьеров слизистых респираторного тракта и выявление генетических предикторов дефектов врожденного и адаптивного иммунного ответа.

Список литературы/References

1. База данных однонуклеотидных полиморфизмов. NCBI dbSNP rs4986790. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4986790#frequency_tab (06.05.2023)
2. База данных однонуклеотидных полиморфизмов. NCBI dbSNP rs5743708. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs5743708> (06.05.2023)
3. Решетникова И.Д., Агафонова Е.В., Хакимов Н.М., Тюрин Ю.А., Шайхразиева Н.Д., Зиятдинов В.Б. Особенности гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 у медицинских работников временного инфекционного госпиталя // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2023. Т. 22, № 1. С. 13–21. [Reshetnikova I.D., Agafonova E.V., Tyurin Yu.A., Shaikhrazieva N.D., Ziatdinov V.B. Features of the formation of seroprevalence to SARS-CoV2 in the population of the Republic of Tatarstan during the spread of COVID-19. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*, 2023, vol. 22, no. 1, pp. 13–21. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2023-22-1-13-21
4. Aboudounya M.M., Heads R.J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators Inflamm.*, 2021, no. 2021: 8874339. doi: 10.1155/2021/8874339
5. Henn V., Slupsky J.R., Gräfe M., Anagnostopoulos I., Förster R., Müller-Berghaus G., Kroczeck R.A. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998, vol. 391, no. 6667, pp. 591–594. doi: 10.1038/35393
6. Iwata S., Tanaka Y. [The importance of B cell-T cell interaction in autoimmune diseases]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2015, vol. 38, no. 5, pp. 398–402. (In Japan.) doi: 10.2177/jsci.38.398
7. Khanmohammadi S., Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, vol. 93, no. 5, pp. 2735–2739. doi: 10.1002/jmv.26826
8. Larsen M.D., de Graaf E.L., Sonneveld M.E., Plomp H.R., Nouta J., Hoepel W., Chen H.J., Linty F., Visser R., Brinkhaus M., Šuštić T., de Taeye S.W., Bentlage A.E.H., Toivonen S., Koeleman C.A.M., Sainio S., Kootstra N.A., Brouwer P.J.M., Geyer C.E., Derksen N.I.L., Wolbink G., de Winther M., Sanders R.W., van Gils M.J., de Bruin S., Vlaar A.P.J.; Amsterdam UMC COVID-19; biobank study group; Rispens T., den Dunnen J., Zaaijer H.L., Wuhrer M., Ellen van der Schoot C., Vidarsson G. Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science*, 2021, vol. 371, no. 6532: eabc8378. doi: 10.1126/science.abc8378
9. Long Q.X., Liu B.Z., Deng H.J., Wu G.C., Deng K., Chen Y.K., Liao P., Qiu J.F., Lin Y., Cai X.F., Wang D.Q., Hu Y., Ren J.H., Tang N., Xu Y.Y., Yu L.H., Mo Z., Gong F., Zhang X.L., Tian W.G., Hu L., Zhang X.X., Xiang J.L., Du H.X., Liu H.W., Lang C.H., Luo X.H., Wu S.B., Cui X.P., Zhou Z., Zhu M.M., Wang J., Xue C.J., Li X.F., Wang L., Li Z.J., Wang K., Niu C.C.,

- Yang Q.J., Tang X.J., Zhang Y., Liu X.M., Li J.J., Zhang D.C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.L., Chen J., Huang A.L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 6, pp. 845–848. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
10. López E.L., Ferolla F.M., Toledano A., Yfran E.W., Giordano A.C., Carrizo B., Feldman F., Talarico L.B., Caratozzolo A., Contrini M.M., Acosta P.L.; GUTI Respiratory Infections Network. Genetic Susceptibility to Life-threatening Respiratory Syncytial Virus Infection in Previously Healthy Infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2020, vol. 39, no. 11, pp. 1057–1061. doi: 10.1097/INF.0000000000002827
 11. Lorkiewicz P., Waszkiewicz N. Biomarkers of Post-COVID Depression. *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, no. 18: 4142. doi: 10.3390/jcm10184142
 12. Menden H.L., Mabry S.M., Venkatraman A., Xia S., DeFranco D.B., Yu W., Sampath V. The SARS-CoV-2 E protein induces Toll-like receptor 2-mediated neonatal lung injury in a model of COVID-19 viremia that is rescued by the glucocorticoid ciclesonide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2023, vol. 324, no. 5, pp. L722–L736. doi: 10.1152/ajplung.00410.2022
 13. Miri-Moghaddam E., Farhad Mollashahi N., Naghibi N., Garme Y., Bazi A. Arg753Gln and Arg677 Trp Polymorphisms of Toll-Like Receptor 2 In Acute Apical Abscess. *J. Dent. (Shiraz)*, 2018, vol. 19, no. 2, pp. 109–117.
 14. Peghin M., Palese A., Venturini M., De Martino M., Gerussi V., Graziano E., Bontempo G., Marrella F., Tommasini A., Fabris M., Curcio F., Isola M., Tascini C. Post-COVID-19 symptoms 6 months after acute infection among hospitalized and non-hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, vol. 27, no. 10, pp. 1507–1513. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.033
 15. Rojas M., Rodríguez Y., Acosta-Ampudia Y., Monsalve D.M., Zhu C., Li Q.Z., Ramírez-Santana C., Anaya J.M. Autoimmunity is a hallmark of post-COVID syndrome. *J. Transl. Med.*, 2022, vol. 20, no. 1: 129. doi: 10.1186/s12967-022-03328-4
 16. Root-Bernstein R. Innate Receptor Activation Patterns Involving TLR and NLR Synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and Sepsis Cytokine Storms: A Review and Model Making Novel Predictions and Therapeutic Suggestions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 4: 2108. doi: 10.3390/ijms22042108
 17. Zanza C., Romenskaya T., Manetti A.C., Franceschi F., La Russa R., Bertozzi G., Maiese A., Savioli G., Volonnino G., Longhitano Y. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. *Medicina (Kaunas)*, 2022, vol. 58, no. 2: 144. doi: 10.3390/medicina58020144
 18. Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X., Yuan J., Li T., Li J., Qian S., Hong C., Wang F., Liu Y., Wang Z., He Q., Li Z., He B., Zhang T., Fu Y., Ge S., Liu L., Zhang J., Xia N., Zhang Z. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 16, pp. 2027–2034. doi: 10.1093/cid/ciaa344
 19. Zhao Y., Kuang M., Li J., Zhu L., Jia Z., Guo X., Hu Y., Kong J., Yin H., Wang X., You F. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res.*, 2021, vol. 31, no. 7, pp. 818–820. doi: 10.1038/s41422-021-00495-9
 20. Żukowski M., Taryma-Leśniak O., Kaczmarczyk M., Kotfis K., Szydłowski Ł., Ciechanowicz A., Brykczyński M., Żukowska A. Relationship between toll-like receptor 2 R753Q and T16934A polymorphisms and *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Anaesthesiol Intensive Ther.*, 2017, vol. 49, no. 2, pp. 110–115. doi: 10.5603/AIT.a2017.0027

Авторы:

Решетникова И.Д., к.м.н., доцент, зам. директора по научной работе ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

Тюрин Ю.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией иммунологии и разработки аллергенов ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Мустафин И.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Агафонова Е.В., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики консультативно-диагностической поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; ассистент кафедры пропедевтики детских болезней ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Шайхразиева Н.Д., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и дезинфектологии Казанской государственной медицинской академии — филиала ГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, г. Казань, Россия.

Authors:

Reshetnikova I.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Deputy Head of Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation; Associate Professor of the Department of Internal Medicine, Department of Fundamental Clinical Medicine, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation;

Tyurin Yu.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Head of Immunology Laboratory, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Mustafin I.G., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Agafonova E.V., PhD (Medicine), Laboratory Diagnostics Doctor, Diagnostics Centre of Infection-Allergic Diseases, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Propedeutics of Child Diseases, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Shaykhrasieva N.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Desinfectology, Kazan State Medical Academy — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation.