

2021



ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Лечение папилломавирусной инфекции человека у ВИЧ-инфицированных пациентов» (авторы: В.С. Смирнов, Т.А. Кудрявцева) (с. 79–84)

Illustrations for the article “Treatment of human papillomavirus infection in HIV-infected patients” (authors: Smirnov V.S., Kudryavtseva T.A.) (pp. 79–84)

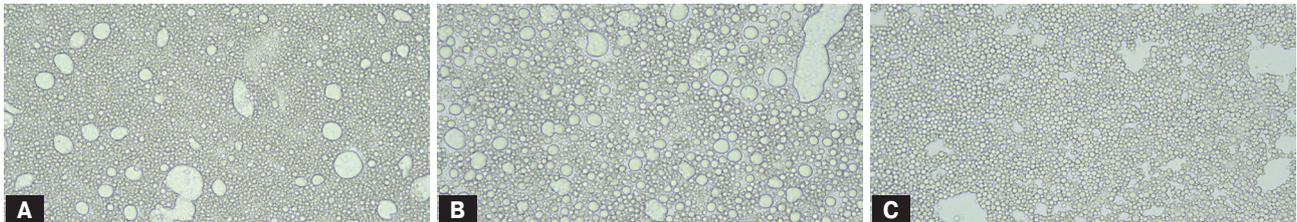


Figure. Dispersity of medication: A – Aldara (original drug), B – Kerawort (generic drug), C – Vartocid (drug created by JSC MBSPC “Cytomed”) in the form of 5% oil-in-water emulsion type cream

MIKMED microscope, x400 magnification, regular illumination [2].

Иллюстрации к статье «Морфометрическая характеристика эффектов фракций липополисахарида *Ensifer meliloti* на паренхиматозные органы лабораторных крыс с вторичным иммунодефицитом» (авторы: А.Р. Мавзютов, Л.Р. Глазутдинова, Д.В. Санычюков, В.С. Щекин, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чижова, А.Р. Габдрахманова) (с. 93–100)

Illustrations for the article “Morphometric characteristics of effects induced by *Ensifer meliloti* lipopolysaccharide fractions on parenchymatous organs in laboratory rats with secondary immunodeficiency” (authors: Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shchekin V.S., Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R.) (pp. 93–100)

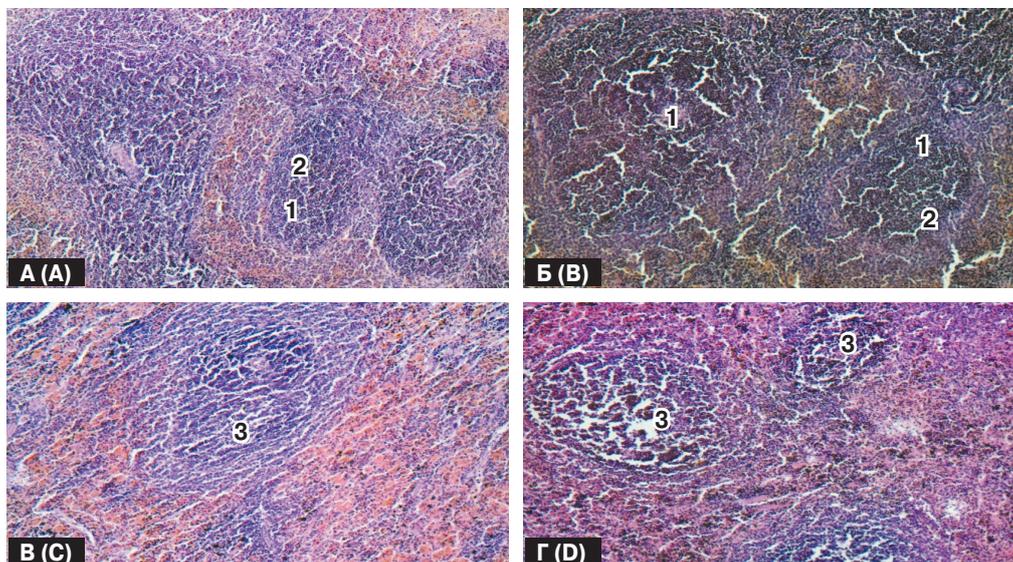


Рисунок 2. Гистологическая картина селезенки

Figure 2. The histological image of the spleen

A — контрольная группа, Б — группа иммунодефицит, В — группа «Ликопид», Г — группа ЛПС. 1 — лимфоидный фолликул, 2 — мантийная зона, 3 — герминативный центр. Световая микроскопия. Увеличение ×100. Окраска: гематоксилин-эозин.
A — control group, B — immunodeficient group, C — Licopid group, D — LPS group. 1 — lymphoid follicle, 2 — mantle zone, 3 — germinal center. Light microscopy. Objective magnification ×100. Staining: HE.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

январь–февраль

2021, том 11

№ 1

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

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
- Барбеито Л.** д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
- Брей П.** д.б.н., профессор, директор Института Пастера в Лаосе, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней, Вьентьян, Лаос
- Гинцбург А.Л.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
- Дозо Ч.** д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада
- Лаврентьева И.Н.** д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Лобзин Ю.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
- Лоуэир Э.** профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис
- Львов Д.К.** д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
- Мануссакис М.** директор Института Пастера Греции, Афины, Греция
- Медуницын Н.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
- Михайлов М.И.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
- Найденски Х.** д.м.н., профессор, директор Института микробиологии им. Стефана Ангелюффа, зав. отделом инфекционной микробиологии, София, Болгария
- Онищенко Г.Г.** д.м.н., профессор, академик РАН, первый заместитель председателя Комитета Государственной Думы по образованию и науке, Москва, Россия
- Покровский В.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
- Сантони А.** зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
- Симбирцев А.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
- Тотоян Артем А.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Фрейдли И.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Хайтов Р.М.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия
- Черешнев В.А.** д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
- Шпигель А.** д.м.н., профессор, директор Института Пастера Мадагаскара, Антананариву, Мадагаскар

Редакционный совет

Алешкин В.А.	д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
Бухарин О.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
Вишневский Б.И.	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
Долгушин И.И.	д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
Зверев В.В.	д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Зуева Л.П.	д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
Кафтырева Л.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Кашкин К.П.	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
Кубарь О.И.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Малеев В.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
Нарвская О.В.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Савичева А.М.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Сельков С.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Тец В.В.	д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
Харит С.М.	д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Чекнев С.Б.	д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия
Шкарин В.В.	д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

Ответственный секретарь: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

Редактор перевода: Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Выпускающий редактор: Мурадян А.Я., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Учредители

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Адрес редакции:

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

Издательство НИИЭМ имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 232-07-42.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»

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

Подписано в печать 16.02.2021 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1046

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2021
© НИИЭМ имени Пастера, 2021
© СПб РО РААКИ, 2021

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

January–February

2021, volume 11

No. 1

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

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

Luis Barbeito PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Director, Montevideo, Uruguay

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

Charles M. Dozois PhD, MD (Biology), Professor, INRS — Institute Armand Frappier, Director, Quebec, Canada

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

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

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

Hechmi Louzir Professor, Institute Pasteur de Tunis, Director, Tunis, Tunisia

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

Menelaos N. Manoussakis Hellenic Pasteur Institute, Director, Athens, Greece

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

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

Hristo Najdenski PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Stephan Angeloff, Director; Department of Infectious Microbiology, Head, Sofia, Bulgaria

Gennadiy G. Onishchenko PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, First Deputy Chairman of the State Duma Committee on Education and Science, Moscow, Russian Federation

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

Angela Santoni PhD, Professor, Institute Pasteur-Fondation Cenci Bolognetti, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

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

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

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

Rahim M. Khaitov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Valery A. Chereshev PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation

Andre Spiegel PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Madagascar, Director, Antananarivo, Madagascar

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin	PhD, MD (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	PhD, MD (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation, Director; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
Ludmila P. Zueva	PhD, MD (Medicine), Professor, I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, St. Petersburg, Russian Federation
Lidiia A. Kaftyreva	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Olga V. Narvskaya	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei A. Selkov	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
Viktor V. Tets	PhD, MD (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	PhD, MD (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei B. Cheknev	PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation
Vyacheslav V. Shkarin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Assistant editor: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)

Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)

Copy editor: Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)

Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

Founders

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

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

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

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

Since 2012, the Infection and Immunity journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission 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) 232-07-42.
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 16.02.2021. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2021

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2021

© SPb RAACI, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Куличенко А.Н., Саркисян Н.С.

К ВОПРОСУ О ТОЧНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-2019 9

Кубарь О.И., Бичурина М.А., Романенкова Н.И.

ВТОРОЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОММЕНТАРИЙ К COVID-19 (год спустя) 17

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А.

НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: УЧАСТИЕ В ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ И РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ. ЧАСТЬ II 25

Вакуленко Ю.А., Лукашев А.Н., Девяткин А.А.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ФИЛОГЕНЕТИКИ В ВИРУСОЛОГИИ 42

Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Ланцева К.С.

РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИИ КОКСАКИВИРУСА В3 57

Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Суворов А.Н., Сварваль А.В.

ИНФЕКЦИЯ *HELICOBACTER PYLORI* И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КИШЕЧНИКА 68

Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А.

ЛЕЧЕНИЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ 79

Оригинальные статьи

Ахматова Н.К., Грубер И.М., Кукина О.М., Ахматова Э.А., Макаренко И.Д., Столпникова В.Н., Калиниченко Е.О., Бишева И.А., Сходова С.А.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ ПНЕВМОКОККОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У МЫШЕЙ 85

Мавзютов А.Р., Глазутдинова Л.Р., Саньчков Д.В., Щекин В.С., Гарафутдинов Р.Р., Чижова А.В., Габдрахманова А.Р.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТОВ ФРАКЦИЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ENSIFER MELILOTI* НА ПАРЕНХИМАТОЗНЫЕ ОРГАНЫ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ВТОРИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ 93

Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Русинова Т.В., Павленко В.Н., Юцкевич Я.А., Барова Н.К., Тараканов В.А.

РЕМОДЕЛЛИНГ ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG2, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG2 В СОЗДАННОЙ *DE NOVO* ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В СИСТЕМЕ *IN VITRO* 101

Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В.

ОСНОВНЫЕ И МАЛЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ 111

Ермилова О.С., Гинько Э.И., Белявская В.А.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВАКЦИНАЦИИ И УРОВНИ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ У ЛИЦ, РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ 123

Кригер Е.А., Самодова О.В., Титова Л.В.

ИММУНИТЕТ К КОКЛЮШУ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С СЕРОНЕГАТИВНЫМ СТАТУСОМ 131

Кливлеева Н.Г., Онгарбаева Н.С., Баймухаметова А.М., Сактаганов Н.Т., Лукманова Г.В., Глебова Т.И., Саятов М.Х., Березин В.Э., Нусупбаева Г.Е., Айкимбаев А.М.

ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРИППА И ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У НАСЕЛЕНИЯ КАЗАХСТАНА В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2018–2019 гг. 137

Котова В.О., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Бельды В.Н., Кирдяшова С.Е.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ НАНАЙСКОГО РАЙОНА ХАБАРОВСКОГО КРАЯ 148

Краткие сообщения

Кукушкина Е.А., Котелева С.И., Бляхер М.С., Федорова И.М., Рамазанова З.К., Зверева Н.Н., Новосад Е.В., Самков А.А., Базарова М.В.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ИНТЕРФЕРОНОВОЙ ЗАЩИТЫ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ 157

Найденова Е.В., Каливоги С., Карташов М.Ю., Бойко А.В., Бумбали С., Сафронов В.А., Захаров К.С., Нассер А., Дrame Ф., Константинов О.К., Магассуба Н'Ф., Буаро М.Й., Щербакова С.А., Кутырев В.В.

НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ УРОВНЕ ИММУННОЙ ПРОСЛОЙКИ НАСЕЛЕНИЯ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ЛИХОРАДКИ КУ 165

Бичурина М.А., Филипович-Вигньевич С.Б., Антипова А.Ю., Банцевич М.Д., Лаврентьева И.Н.

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К ВИРУСАМ КОРИ И КРАСНУХИ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ СЕРБИЯ 171

Григорьева С.А., Косырева А.Н., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Бакштановская И.В., Кальгина Г.А., Курлаева Л.В.

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОПИСТОРХОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА 177

Зайцева Е.А., Лучанинова В.Н., Мельникова Е.А., Коменкова Т.С., Крукович Е.В.

КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ENTEROCOCCUS FAECALIS 184

Волощук Л.В., Го А.А., Писарева М.М., Гужов Д.А., Бичурина М.А., Петрова П.А.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ В ЭПИДСЕЗОН 2018–2019 гг. 191

Правила для авторов 197

Авторский указатель 200

Предметный указатель 200

CONTENTS

Reviews

Kulichenko A.N., Sarkisyan N.S.

TO THE QUESTION REGARDING ACCURACY OF COVID-2019 LABORATORY DIAGNOSTICS 9

Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I.

SECOND ETHICAL COMMENTS TOWARDS COVID-19 (one year later) 17

Dolgushin I.I., Mezentseva E.A.

NEUTROPHIL GRANULOCYTES: PARTICIPATION IN HOMEOSTATIC AND REPARATIVE PROCESSES. PART II 25

Vakulenko Yu.A., Lukashev A.N., Deviatkin A.A.

THE USE OF STATISTICAL PHYLOGENETICS IN VIROLOGY 42

Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Lantseva K.S.

DEVELOPMENT OF ANTIVIRAL THERAPEUTICS COMBATING COXSACKIEVIRUS TYPE B3 INFECTION 57

Uspenskiy Yu.P., Baryshnikova N.V., Suvorov A.N., Svarval A.V.

HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASES 68

Smirnov V.S., Kudryavtseva T.A.

TREATMENT OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN HIV-INFECTED PATIENTS 79

Original articles

*Akhmatova N.K., Gruber I.M., Kukina O.M., Akhmatova E.A., Makarenkova I.D., Stolpnikova V.N., Kalinichenko E.O.,
Bisheva I.A., Skhodova S.A.*

**EFFECTS OF EXPERIMENTAL PROTEIN-CONTAINING PNEUMOCOCCAL PREPARATIONS ON MATURATION
OF MURINE DENDRITIC CELLS** 85

Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shchekin V.S., Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R.

**MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF EFFECTS INDUCED BY *ENSIFER MELILOTI*
LIPOPOLYSACCHARIDE FRACTIONS ON PARENCHYMATOUS ORGANS IN LABORATORY
RATS WITH SECONDARY IMMUNODEFICIENCY** 93

Nesterova I.V., Chudilova G.A., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Yutskevich Ya.A., Barova N.K., Tarakanov V.A.

**PHENOTYPE REMODELING IN NEUTROPHILIC GRANULOCYTE SUBSETS CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG,
CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG IN *DE NOVO* EXPERIMENTAL MODEL OF VIRAL-BACTERIAL INFECTION *IN VITRO*** 101

Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Monakhova N.E., Bessonova T.V.

**MAJOR AND MINOR LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD AND CEREBROSPINAL
FLUID OF CHILDREN WITH MENINGITIS** 111

Ermilova O.S., Ghinko Z.I., Belyavskaya V.A.

**HUMORAL IMMUNITY, VACCINATION PERIOD AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF FIRST IMMUNIZED
SMALLPOX VACCINE RECIPIENTS** 123

Krieger E.A., Samodova O.V., Titova L.V.

PERTUSSIS IMMUNITY IN PREGNANT WOMEN AND FACTORS ASSOCIATED WITH SERONEGATIVE STATUS 131

*Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Baimukhametova A.M., Saktaganov N.T., Lukmanova G.V., Glebova T.I., Sayatov M.Kh.,
Berezin V.E., Nusupbaeva G.E., Aikimbayev A.M.*

**DETECTION OF INFLUENZA VIRUS AND PATHOGENS OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS
IN POPULATION OF KAZAKHSTAN DURING 2018–2019 EPIDEMIC SEASON** 137

Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A., Trotsenko O.E., Beldy V.N., Kirdyashova S.E.

GENETIC DIVERSITY OF HEPATITIS C VIRUS IN NANAIA REGION, KHABAROVSK TERRITORY 148

Short communications

*Kukushkina E.A., Koteleva S.I., Blyakher M.S., Fedorova I.M., Ramazanova Z.K., Zvereva N.N.,
Novosad E.V., Samkov A.A., Bazarova M.V.*

**ALTERED INTERFERON DEFENSE IN CHILDREN WITH DYNAMICALLY CHANGED
INFECTIOUS MONONUCLEOSIS 157**

*Naidenova E.V., Kalivogui S., Kartashov M.Yu., Boyko A.V., Boubaly S., Safronov V.A., Zakharov K.S., Nassour A.A.,
Drame F., Konstantinov O.K., Magassouba N'F., Boiro M.Y., Scherbakova S.A., Kuttyrev V.V.*

**NEW DATA ON THE LEVEL OF IMMUNE STRATUM AGAINST Q FEVER AGENT IN POPULATION
OF THE OF REPUBLIC OF GUINEA 165**

Bichurina M.A., Filipović-Vignjević S., Antipova A.Yu., Bančević M., Lavrentieva I.N.

**A HERD IMMUNITY TO MEASLES AND RUBELLA VIRUSES IN THE POPULATION
OF THE REPUBLIC OF SERBIA 171**

Grigorieva S.A., Kosyreva A.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B., Bakshantovskaya I.V., Kalgina G.A., Kurlaeva L.V.

**IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN CHRONIC OPISTHORCHIASIS PATIENTS RELATED TO GENES
POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH DEVELOPING ISCHEMIC HEART DISEASE 177**

Zaitseva E.A., Luchaninova V.N., Melnikova E.A., Komenkova T.S., Krukovich E.V.

**CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF ENTEROCOCCUS FAECALIS-ASSOCIATED
URINARY TRACT INFECTION 184**

Voloshchuk L.V., Go A.A., Pisareva M.M., Guzhov D.A., Bichurina M.A., Petrova P.A.

**CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF INFLUENZA INFECTION IN HOSPITALIZED
ADULT PATIENTS DURING THE 2018–2019 EPIDEMIC SEASON 191**

Instructions to Authors 197

Author index 200

Subject index 200

К ВОПРОСУ О ТОЧНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-2019

А.Н. Куличенко, Н.С. Саркисян

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Рассмотрены вопросы точности (чувствительности и специфичности) ПЦР-анализа в зависимости от особенностей выполнения преаналитического и аналитического этапов лабораторной диагностики COVID-19, а также сравнение результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и компьютерной томографии (КТ) легких. В настоящее время основным методом диагностики новой коронавирусной инфекции COVID-19 является молекулярно-генетический тест — ПЦР. По данным на 1 ноября 2020 г. методом ПЦР в мире проведено более 750 млн исследований. Накопленный к настоящему времени опыт позволяет оценить диагностическую чувствительность метода в 82–91%, специфичность — в 99–100%. Имеются данные о повышении чувствительности ПЦР при повторном исследовании образцов из верхних дыхательных путей, которая составила 82,2% при первичном анализе и 90,6% после двух последовательных тестов. На точность анализа оказывает влияние целый ряд факторов. Причинами ложноотрицательных результатов молекулярных тестов могут быть недостаточное количество генетического материала вируса в пробе, сроки и погрешности при отборе биологических образцов. Установлено, что РНК вируса SARS-CoV-2 с максимальной диагностической чувствительностью выявляется в верхних дыхательных путях за 1–3 дня до появления симптомов и далее в течение 5–6 дней после начала болезни. В этот период наблюдается наивысший риск передачи возбудителя инфекции. На второй неделе болезни отмечается увеличение частоты детекции вирусной РНК в бронхо-легочном материале. Продолжительность детекции маркеров вируса (в том числе при отсутствии жизнеспособных форм) коррелирует с тяжестью заболевания и может достигать 1–2 мес. Другая реальная проблема ПЦР-анализа — возможность ложноположительных ответов. Ее решение требует высокого уровня организации лабораторных исследований, особенно при их значительных объемах. При этом важно, что положительные ответы ПЦР означают присутствие в образце не жизнеспособного вируса, а только фрагментов его РНК. Отмечено, что ПЦР-анализ имеет большую специфичность по сравнению с КТ, которая не дает возможности отличить пневмонию, вызванную SARS-CoV-2, от пневмоний другой этиологии (до 25% ложноположительных ответов). Но диагностическая чувствительность КТ составляет 97,2%, что превышает значение этого показателя для ПЦР на 10–15%. Сделано заключение, что только комплексный подход с использованием ПЦР и КТ, с учетом особенностей этих методов и факторов, влияющих на точность получаемых данных, позволяет правильно интерпретировать результаты диагностики.

Ключевые слова: COVID-19, вирус SARS-CoV-2, диагностическая чувствительность, аналитическая чувствительность, ОТ-ПЦР, компьютерная томография.

TO THE QUESTION REGARDING ACCURACY OF COVID-2019 LABORATORY DIAGNOSTICS

Kulichenko A.N., Sarkisyan N.S.

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Issues of accuracy (sensitivity and specificity) of PCR-analysis depending on features of performing preanalytical and analytical stages of laboratory diagnostics of COVID-19, as well as comparing PCR and lung computed tomography (CT)

Адрес для переписки:

Саркисян Нушик Саакювна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (962) 425-01-29.
E-mail: nyshik25@yandex.ru

Contacts:

Nushik S. Sarkisyan
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (962) 425-01-29.
E-mail: nyshik25@yandex.ru

Для цитирования:

Куличенко А.Н., Саркисян Н.С. К вопросу о точности лабораторной диагностики COVID-2019 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 9–16. doi: 10.15789/2220-7619-TTQ-1622

Citation:

Kulichenko A.N., Sarkisyan N.S. To the question regarding accuracy of COVID-2019 laboratory diagnostics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 9–16. doi: 10.15789/2220-7619-TTQ-1622

results have been analyzed in the study. Currently, a molecular genetic test based on polymerase chain reaction (PCR) is used for diagnostics of a new coronavirus infection (COVID-19). As of November 1, 2020, more than 750 million PCR tests have been conducted globally. Evidence accumulated by now allows to estimate diagnostic sensitivity and specificity of the SARS-CoV-2-specific PCR as high as 82–91% and 99–100%, respectively. In addition, increased PCR sensitivity may be noted upon performing repeated testing of the upper respiratory tract samples comprising 82.2% during the primary analysis that was further elevated up to 90.6% after two consecutive tests. A whole set of factors affect the PCR accuracy. In particular, false negative data might result from insufficient amount of virus-coupled genetic material in the sample, timeframe and mistakes made upon selecting biological samples. It was found that SARS-CoV-2 virus RNA was detected at the maximum diagnostic sensitivity in the upper respiratory tract 1–3 days before the onset of symptoms and sustained within the 5–6 days after disease onset. Such period of time is associated with the peak risk of SARS-CoV-2 transmission. On week 2 after disease onset, there have been noted elevated rate of detecting viral RNA in bronchopulmonary samples. The duration of detecting virus-related markers (including those found in the absence of viable virus forms) correlates with disease severity and may last for as long as 1–2 months. Another real-world issue related to PCR analysis is posed by an opportunity of obtaining false positive data, which solution requires high level organized laboratory research, especially in case large-scale studies. Upon that, it is worth noting that positive PCR results may account for detecting solely certain RNA-related fragments present in any sample, rather than a viable virus. It was noted that PCR in comparison to CT analysis demonstrates higher specificity, but does not allow to distinguish pneumonia caused by SARS-CoV-2 from pneumonia caused by other etiological agents (up to 25% false positive results). However, the diagnostic CT sensitivity was 97.2% that exceeds such parameter for PCR by 10–15%. It was concluded that the approach combining use of both PCR and CT by taking into account their own features as well as factors affecting the accuracy of the data obtained, allows us to correctly interpret the diagnostical results.

Key words: COVID-19, virus SARS-CoV-2, diagnostic sensitivity, analytical sensitivity, RT-PCR, computer tomography.

Введение

Своевременная и качественная диагностика — один из ключевых факторов в борьбе с COVID-19. Сегодня метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является своего рода «золотым стандартом» при диагностике вирусных и ряда других инфекций. Поэтому вполне очевидно, что именно ПЦР стала основой лабораторного диагноза при COVID-19.

Значительно реже для диагностики COVID-19 применяли другой молекулярно-генетический тест — петлевою изотермическую амплификацию (LAMP). Аналитическая чувствительность метода LAMP при диагностике новой коронавирусной инфекции определена как ~ 10 г.-э./мл [18], диагностическая чувствительность метода, описанная в публикациях специалистов из Китая, составляла в среднем 98%, специфичность — 99% [14, 43, 44]. К преимуществам LAMP относят изотермичность реакции, быстроту постановки, возможность работы с нативным образцом и визуального учета результатов. В то же время сложности эксплуатации наборов, возникновение неспецифичной флуоресценции, проблемы с созданием мультиплексных вариантов — причины, сдерживающие внедрение метода, пока так и не получившего широкого распространения.

Многие страны, в том числе Китай, США, в начале вспышки COVID-19 сталкивались с проблемой точности диагностики [4].

О диагностической точности применяемых тест-систем (методов) судят, в первую очередь, на основании оценки их чувствительности и специфичности.

Принятая для тест-систем аналитическая чувствительность метода ОТ-ПЦР составляет

порядка 1×10^3 г.-э./мл. Широко используемый в Российской Федерации диагностический набор производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора («Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG») детектирует 1×10^5 копий/мл (согласно инструкции по применению набора «Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG», [1]), наборы «АмплиСенс® Cov-Bat-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), «COVID-2019 Amp» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) — 1×10^3 г.-э./мл (согласно инструкциям к набору реагентов). Повышение аналитической чувствительности может достигаться путем увеличения количества РНК-мишеней до двух и более.

На 1 ноября 2020 г. методом ПЦР в мире проведено более 750 млн исследований по выявлению вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР, при этом диагностическая чувствительность существующих тест-систем составляла, по данным различных авторов, 60–98% [2, 5, 25, 42].

На точность диагностики оказывает влияние целый ряд факторов. Причиной ложноотрицательных результатов молекулярных тестов могут быть недостаточное количество генетического материала вируса в пробе, сроки и погрешности при отборе биологических образцов.

Также существует возможность получения при постановке ПЦР ложноположительных ответов. Несмотря на уменьшение рисков ДНК (РНК)-контаминации при выполнении ПЦР в реальном времени, по сравнению с электрофорезным форматом учета результатов, эта проблема сохраняет свою значимость и требует высокого уровня организации лабораторных исследований, особенно при их значительных объемах. При этом следует иметь в виду, что положительные ответы ПЦР не означают при-

сутствие в образце живого вируса, так как метод выявляет только фрагменты РНК — маркеры SARS-CoV-2.

Вопросы точности лабораторного исследования неразрывно связаны с особенностями выполнения преаналитического и аналитического этапов диагностики. Можно выделить следующие факторы, во многом определяющие точность диагностического анализа, которые необходимо учитывать при планировании и выполнении преаналитического этапа работ.

1. Исследуемая группа (выборка) и сроки забора материала. В зависимости от времени, прошедшего после начала заболевания, и клинических проявлений (тяжести течения) вероятность нахождения вируса в исследуемых биологических образцах может меняться [30]. Это напрямую влияет на точность лабораторного диагноза. При оценке диагностической чувствительности тест-систем на новую коронавирусную инфекцию обычно выделяют следующие группы пациентов (больных COVID-19):

- больные с выраженными клиническими проявлениями (повышение температуры > 38°C, кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты), одышка, миалгия, чувство «стеснения» в грудной клетке, полиорганная недостаточность, изменения на компьютерной томограмме легких значительные или субтотальные, развитие острого респираторного дистресс-синдрома);
- больные с незначительными клиническими проявлениями (повышение температуры до 38°C, боль в горле, насморк, отсутствие обоняния и вкуса, одышка, утомляемость, признаки конъюнктивита, изменения на компьютерной томограмме легких — типичные для вирусного поражения, объем поражения минимальный или средний) [3];
- пациенты с бессимптомным течением.

В течение 5–6 дней от начала появления симптомов наиболее высокая вирусная нагрузка определяется в верхних дыхательных путях и менее высокая — в нижних [31, 49]. На второй неделе болезни отмечается увеличение частоты детекции вирусной РНК в бронхо-легочном материале [36].

Представляет интерес вопрос возможности детекции РНК вируса в инкубационный период, который составляет от 1 до 14 дней, в среднем — 5 дней [37]. Установлено, что РНК вируса SARS-CoV-2 выявляется у пациентов за 1–3 дня до появления симптомов [10, 15, 24, 28, 31, 34, 36, 40, 46, 48, 49]. Приводятся данные о том, что высокая концентрация вируса SARS-CoV-2 в верхних дыхательных путях в этот период и в начале появления симптомов (5 дней) сочетается с наивысшим риском передачи инфекции [28, 48]. Также имеются результаты наблюдений, свидетельствующие, что

вирусная нагрузка в верхних дыхательных путях может быть одинаковой как у людей с клинически выраженным заболеванием, так и у лиц с бессимптомным течением болезни [49].

Приводятся данные, что при взятии материала у больных группы наблюдения в первый день проявления симптомов положительный ответ имел место с частотой в среднем — 94%, к 10 дню — 67% [38].

Сведения о диагностической чувствительности ПЦР в различные сроки после появления симптомов заболевания приведены в табл. 1. У некоторых пациентов вирусная РНК может определяться на протяжении всего нескольких дней, тогда как у других лиц она определяется в течение нескольких недель и, возможно, месяцев [9, 17, 22, 47]. Тяжелые больные остаются ПЦР-позитивными дольше, чем пациенты с легким течением заболевания [6, 30].

2. Исследуемый биоматериал. Установлено, что клинический биоматериал из нижних дыхательных путей (мокрота, эндотрахеальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж) имеет больший процент выявления (детекции) РНК SARS-CoV-2, чем образцы из верхних дыхательных путей (ротоглотки и носоглотки) [33].

Частота выявления РНК SARS-CoV-2 на первой неделе заболевания в мазках из носоглотки составляла 63%, из ротоглотки — 32%, из бронхоальвеолярного лаважа — 93% [33], из мокроты — 95% и из слюны — 95% [6]. Представляют

Таблица 1. Диагностическая чувствительность метода ПЦР при исследовании материала в различные сроки болезни

Table 1. Diagnostic sensitivity of the PCR method while examining biological samples at various time points of the disease

Диагностическая чувствительность, % Diagnostic sensitivity, %	Сроки заболевания Disease stage	Ссылка на источник Link to publication
> 90%	В течение 1–3 дней после появления симптомов и до 5-го дня болезни Within 1–3 days after the onset of symptoms and up to the 5 th day of the disease	[6, 30]
до 80% up to 80%	На 6-й день On day 6	[6]
до 70–71% up to 70–71%	На 9–11 дни On day 9–11	[30]
< 50%	На 14-й день On day 14	[6]
< 30%	На 21 день On day 21	[30]

интерес данные об эффективности исследования методом ПЦР воды после полоскания ротовой полости в течение 10 с [29].

Низкий показатель обнаружения РНК SARS-CoV-2 имеет место при исследовании буккальных соскобов, мочи, крови и фекалий [16]. Отмечено, что детекция с помощью ПЦР вируса в кале не является специфическим признаком острого периода инфицирования. Генетический материал вируса может сохраняться в фекалиях до 1 месяца [6].

Показано, что чувствительность ПЦР при исследовании образцов из верхних дыхательных путей при первичном тестировании составила 82,2%, а после двух последовательных тестов — 90,6% [39].

Таким образом, очевидна важность учета вида исследуемого материала и сроков его забора для понимания точности ПЦР-анализа при обследовании на COVID-19.

3. *Порядок отбора и хранение проб* включает соблюдение правил преаналитического этапа

Таблица 2. Сравнительная характеристика инструментального (КТ) и лабораторного (ПЦР) методов диагностики COVID-19

Table 2. Comparative characteristics of instrumental (CT) and laboratory diagnostic (PCR) methods of COVID-19

Показатели Parameters	Лабораторный метод исследования (ПЦР) Laboratory diagnostic method (PCR)	Инструментальный метод исследования (компьютерная томография легких) Instrumental examination method (lung computed tomography)
Диагностическая чувствительность Diagnostic sensitivity	82,2–90,6% [39] 83,3% [26]	96% [41] 97% [4] 97,2% [26] 98% [13]
Диагностическая специфичность Diagnostic specificity	> 99% [27] 99,9–100% [39]	Частота ложноположительных ответов — 25% [4] Rate of false positive results — 25% [4]
Сроки заболевания и максимальная чувствительность метода Disease stage and the maximum sensitivity of method	Через 5–6 дней от начала появления симптомов [31, 49] 5–6 days after the onset of symptoms [31, 49]	2–4 день болезни, достигая максимума на 9–13 день [19, 23, 44] 2–4 days of the disease peaking on day 9–13 [19, 23, 44]
Недостаток метода Shortcoming of method	1. Невозможно отличить «жизнеспособный» вирус от фрагмента его РНК (возможность ложноположительного результата). 2. Время выполнения — 4–5 ч, при массовых обследованиях — до 12 ч. 1. Inability to distinguish a “viable” virus from a fragment of its own RNA (probability of false positive result). 2. Execution time — 4–5 hours, for mass examinations — up to 12 hours.	1. Невозможно отличить пневмонию, вызванную SARS-CoV-2, от пневмоний другой природы (низкая специфичность). 2. Ограничен в доступе ввиду необеспеченности КТ учреждений здравоохранения. 3. Противопоказан беременным, лицам с рядом заболеваний. 4. Развитие аллергической реакции на контрастное вещество. 5. Воздействие радиоактивного облучения. 1. Inability to distinguish between SARS-CoV-2 pneumonia and other types of pneumonia (low specificity). 2. Limited access due to the lack of CT equipment in health care facilities. 3. Contraindicated in pregnant women, persons with certain acute and chronic diseases. 4. Development of allergic reaction against contrast agent. 5. Exposure to radioactive irradiation.
Достоинства метода Advantages of the method	1. Метод высокоспецифичен, нацелен на выявление конкретного патогена. 2. Возможность массового тестирования, доступность. 3. Себестоимость исследования ниже в сравнении с КТ. 1. The method is highly specific, aimed at identifying specific pathogenic agents. 2. Opportunity of mass testing, availability. 3. The cost of the study is lower compared with CT.	1. Быстрый и легко выполнимый метод исследования. 1. Fast and easy to do examination method.

исследований — взятия клинического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки), условий хранения и транспортировки. Основные негативные факторы — недостаточное количество биологического материала на зонде, высыхание зондов (тампонов) после забора пробы, длительное хранение при положительных температурах.

Аналитический этап при выполнении ПЦР (методов амплификации нуклеиновых кислот) во многом определяется «эффективностью» праймеров и зондов («запас прочности» тест-системы). За рубежом для детекции используют различные специфичные для SARS-CoV-2 участки генома вируса: N, E, S, RdRp, ORF (1AB) RdRp/Hel [8, 11, 12, 20, 30]. В Российской Федерации к 3 сентября 2020 г. было зарегистрировано 34 препарата, выявляющих N, E, S, ORF1ab, ORF8 и другие фрагменты РНК вируса.

Заслуживает внимания опыт применения для снижения частоты сомнительных результатов мультилокусных (на две и более мишени) ПЦР-тест-систем. Например, CDC (США) предложен диагностический набор «2019-nCoV» с праймерами-зондами для двух областей гена нуклеокапсида N, а также гена РНКазы Р [7]. В рекомендациях ВОЗ приводится другой набор праймеров: фрагмент гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) и гена оболочки (E). При этом было показано, что обе тест-системы имеют одинаковую высокую чувствительность и специфичность [11, 12, 42]. Оценивая аналитическую чувствительность ПЦР-тест-систем, следует учитывать влияние дизайна праймеров и зондов на эффективность специфической амплификации.

Сравнительная точность ПЦР-анализа и компьютерной томографии (КТ) при диагностике COVID-19. Важный вопрос — сравни-

тельная точность двух основных методов диагностики COVID-19: ОТ-ПЦР и КТ. Текущие исследования в Китае показывают, что КТ — более чувствительный метод диагностического тестирования новой коронавирусной инфекции, позволяющий установить точный диагноз быстрее в среднем на 3 дня [23, 44]. Однако КТ не дает возможности отличить пневмонию, вызванную SARS-CoV-2, от других вирусных пневмоний, а ложноотрицательные результаты составляют более 12% [4]. Также данные КТ не всегда коррелируют с тяжестью заболевания.

В Китае провели ретроспективное исследование для оценки диагностической точности применяемых методов, в которое включили всех пациентов с подозрением на пневмонию, вызванную COVID-19. В первые дни болезни им проводили КТ и ПЦР. Чувствительность КТ составила 97,2%, тогда как чувствительность ПЦР в этот период составила 83,3% [26].

Национальная комиссия здравоохранения Китая пересмотрела диагностические критерии в апреле 2020 г., согласно которым клинический диагноз COVID-19 устанавливается по наличию пневмонии на КТ грудной клетки, независимо от результатов ОТ-ПЦР.

Безусловно, молекулярные методы более специфичны, так как нацелены на идентификацию конкретного патогена. Сравнительный анализ показателей диагностической точности этих двух методов представлен в табл. 2. Оптимально для постановки диагноза COVID-19 проведение и КТ, и лабораторного теста (ПЦР). На практике имеют место случаи несовпадения положительных результатов этих методов [21]. В табл. 3 приведены примерные алгоритмы действий при возникновении таких ситуаций.

Таблица 3. Алгоритм действий при отличающихся результатах ПЦР и КТ при диагностике COVID-19 [3, 4, 19, 26, 32, 35]

Table 3. Algorithm of operating procedures in case of nonoverlapping PCR and CT data during diagnosis of COVID-19 [3, 4, 19, 26, 32, 35]

Результаты диагностики/Diagnostics results	
ПЦР (-) PCR (-)	КТ (+) CT (+)
При наличии эпидситуации пациентов изолируют. ПЦР должна быть проведена повторно в связи с тем, что положительные результаты КТ могут быть готовы в среднем на 3 дня раньше, чем ПЦР. In case of an epidemiological situation patients should be quarantined. RT-PCR should be repeated because CT positive results may occur mean 3 days earlier than RT-PCR data.	
ПЦР (+) PCR (+)	КТ (+) CT (+)
Клинически и лабораторно подтвержденный диагноз. Принимается весь комплекс противэпидемических и лечебных мероприятий. Clinically and laboratory confirmed diagnosis. Entire set of anti-epidemic and therapeutic measures is taken into consideration.	
ПЦР (+) PCR (+)	КТ (-) CT (-)
Положительный диагноз при наличии клинической картины и соответствующей эпидситуации (эпиданамнеза). Повторная КТ через 6 дней. Positive diagnosis in the presence of clinical picture and appropriate epidemiological situation (epidemiological anamnesis). Repeated CT scan in 6 days.	

Заключение

В настоящее время основным методом лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции является молекулярно-генетический тест — ПЦР, позволяющая с высокой чувствительностью детектировать нуклеиновые кислоты вируса в любом материале. Как в случае с другими методами прямого обнаружения маркеров патогенного микроорганизма (вируса), при ПЦР-анализе важное значение имеет вероятность нахождения возбудителя инфекции в исследуемом материале. Именно этот фактор следует учитывать при планировании обследований и интерпретации получаемых с помощью ПЦР результатов.

Данные научных публикаций позволяют достаточно полно охарактеризовать показатели диагностической точности ПЦР-анализа при выявлении вируса SARS-CoV-2 и факторы, оказывающие на них влияние. Это сроки забора материала, с максимальной чувствительностью теста на 5–6 день после появления первых симптомов, тяжесть течения болезни, коррелирующая с продолжительностью детекции маркеров вируса, вид исследуемого материала — большая вероятность нахождения вируса в бронхоальвеолярном лаваже и мокроте (при отделении), по сравнению с материалом из носоглотки и ротоглотки, и низкая выявляемость в крови и моче. При этом даже по самым оптимистичным данным диагностическая чувствительность ПЦР не превышает 90%.

На сегодняшний день алгоритм диагностики новой коронавирусной инфекции включает инструментальный (радиологический) и лабораторный методы исследования. С клинической точки зрения результаты КТ, в сочетании с соответствующим эпидемиологическим анамнезом, могут быть использованы в качестве первого и непосредственного ориентира для врачей с целью начала лечения и принятия необходимых противоэпидемических мер, в то время как ПЦР служит инструментом подтверждения, ее результаты могут быть использованы позже для принятия решения о последующих действиях (изоляция, лечение). Но в то же время необходимо отметить, что здравоохранение многих стран столкнулось с нехваткой компьютерных томографов и квалифицированных специалистов, что делает данный метод недоступным для полномасштабных исследований, в отличие от лабораторного молекулярно-генетического теста. ПЦР-анализ незаменим для обследований контактных лиц, мониторинга заболеваемости.

Таким образом, именно комплексный подход с использованием ПЦР и КТ, с учетом факторов, влияющих на точность диагностики, позволяет обеспечить получение достоверных результатов, правильно интерпретировать их, что необходимо как для постановки верного диагноза конкретному больному, так и для получения объективных данных о заболеваемости населения, своевременного принятия решений о проведении необходимых противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Список литературы/References

1. Бухарова О., Рузанова Н. Найти и обезвредить. Как можно пройти диагностику на коронавирус / Российская газета. 2020. 21 февраля (№ 8092). [Bukharova O., Ruzanova N. Find and disarm. How you can be diagnosed with coronavirus. *Rossiyskaya Gazeta*. 2020. 21 February (no. 8092). (In Russ.)] URL: <https://rg.ru/2020/02/20/kak-mozhno-projiti-diagnostiku-na-koronavirus.html> (20.02.2020)
2. Московские врачи предложили включить больницы для лечения коронавируса и пневмонии в единую систему / mosgorzdrav.ru. 2020. 9 апреля. [Moscow doctors have proposed to include hospitals for the treatment of coronavirus and pneumonia in a single system. *mosgorzdrav.ru*, 2020, 9 April. (In Russ.)] URL: <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/news/default/card/3748.html> (09.04.2020)
3. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): временные методические рекомендации. Версия 9 (26.10.2020). Минздрав РФ, 2020. 236 с. [Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): temporary guidelines. Version 9 (26.10.2020). *Ministry of Health of the Russian Federation*, 2020. 236 p. (In Russ.)]
4. Ai T., Zhenlu Y., Hongyan H., Chenao Z., Chong C., Wenzhi L., Qian T., Ziyong S., Liming X. Correlation of chest CT and RT-PCR testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. *J. Radiology*, 2020, vol. 296, pp. 32–40. doi: 10.1148/radiol.2020200642
5. Alcoba-Florez J., Gil-Campesino H., Garcia-Martinez de Artola D., Gonzalez-Montelongo R., Valenzuela-Fernandez A., Ciuffreda L., Flores C. Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 99, pp. 190–192. doi: 10.1101/2020.06.23.20137455
6. Bergant M., de Marco A. Diagnostics and monitoring of COVID-19 infection — current understanding. *Preprints*, 2020: 2020050316. doi: 10.20944/preprints202005.0316.v1
7. CDC. 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR diagnostic panel: instructions for use. URL: <https://www.fda.gov/media/134922/download> (12.01.2020)
8. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tsoi H.W., Choi G.K., Tam A.R., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang O.T., Yuen K.Y. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, vol. 58, no. 5: e00310–20. doi: 10.1128/JCM.00310–20

9. Chen Y., Liangjun C., Qiaoling D., Guqin Z., Kaisong W., Lan N., Yibin Y., Bing L., Wang W., Chaojie W., Jiong Y., Guangming Y., Cheng Z. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J. Med Virol.*, 2020, vol. 92, no. 7, pp. 833–840. doi: 10.1002/jmv.25825
10. Cheng H.Y., Jian S.W., Liu D.P., Ng T.C., Huang W.T., Lin H.H.; Taiwan COVID-19 Outbreak Investigation Team. Contact tracing assessment of COVID-19 transmission dynamics in taiwan and risk at different exposure periods before and after symptom onset. *JAMA Intern. Med.*, 2020, vol. 180, no. 9, pp. 1156–1163. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.2020
11. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., Dittrich S., Yansouni C.P. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2: a narrative review. *Ann. Intern. Med.*, 2020, vol. 172, no. 11, pp. 726–734. doi: 10.7326/M20-1301
12. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G., Haagmans B.L., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., Goderski G., Romette J.L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans M.P., Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.*, 2020, vol. 25, no. 3: 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
13. Fang Y., Zhang H., Xie J., Lin M., Ying L., Pang P., Ji W. Sensitivity of chest CT for COVID-19: comparison to RT-PCR. *Radiology*, 2020, vol. 296, no. 2, pp. 115–117. doi: 10.1148/radiol.2020200432
14. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei C.L., Hui D.S.C., Du B., Li L.J., Zeng G., Yuen K.Y., Chen R.C., Tang C.L., Wang T., Chen P.Y., Xiang J., Li S.Y., Wang J.L., Liang Z.J., Peng Y.X., Wei L., Liu Y., Hu Y.H., Peng P., Wang J.M., Liu J.Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.J., Qiu S.Q., Luo J., Ye C.J., Zhu S.Y., Zhong N.S.; China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 18, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
15. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., Lau Y.C., Wong J.Y., Guan Y., Tan X., Mo X., Chen Y., Liao B., Chen W., Hu F., Zhang M., Wu Y., Zhao L., Zhang F., Cowling B.J., Li F., Leung G.M. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med.*, 2020, vol. 26, no. 5, pp. 672–675. doi: 10.1038/s41591-020-0869-5
16. Hu E. COVID-19 testing: challenges, limitations and suggestions for improvement. *Preprints 2020: 2020040155*. doi: 10.20944/preprints202004.0155.v1
17. Hu Z., Song C., Xu C., Jin G., Chen Y., Xu X., Ma H., Chen W., Lin Y., Zheng Y., Wang J., Hu Z., Yi Y., Shen H. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Sci. China Life Sci.*, 2020, vol. 63, no. 5, pp. 706–711. doi: 10.1007/s11427-020-1661-4
18. James A.S., Alawneh J.I. COVID-19 infection diagnosis: potential impact of isothermal amplification technology to reduce community transmission of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)*, 2020, vol. 10, no. 6: 399. doi: 10.3390/diagnostics10060399
19. Kanne J.P., Little B.P., Chung J.H., Elicker B.M., Ketani L.H. Essentials for radiologists on COVID-19: an update — radiology scientific expert panel. *Radiology*, 2020, vol. 296, no. 2, pp. 113–114. doi: 10.1148/radiol.2020200527
20. Kim S., Kim D., Lee B. Insufficient sensitivity of RNA dependent RNA polymerase gene of SARS-CoV-2 viral genome as confirmatory test using Korean COVID-19 cases. *Preprints*, 2020: 2020020424. doi: 10.20944/preprints202002.0424.v1
21. Li D., Wang D., Dong J., Wang N., Huang H., Xu H., Xia C. False-negative results of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: role of deep-learning-based CT diagnosis and sights from two cases. *Korean J. Radiol.*, 2020, vol. 21, no. 4, pp. 505–508. doi: 10.3348/kjr.2020.0146
22. Li N., Wang X., Lv T. Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: not a rare phenomenon. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 11, pp. 2286–2287. doi: 10.1002/jmv.25952
23. Li Y., Xia L. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): role of chest CT in diagnosis and management. *Am. J. Roentgenol.*, 2020, vol. 214, no. 6, pp. 1280–1286. doi: 10.2214/AJR.20.22954
24. Liu W.D., Chang S.Y., Wang J.T., Tsai M.J., Hung C.C., Hsu C.L., Chang S.C. Prolonged virus shedding even after seroconversion in a patient with COVID-19. *J. Infect.*, 2020, vol. 81, no. 2, pp. 318–356. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.063
25. Loeffelholz M.J., Tang Y.W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections — the state of the art. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 747–756. doi: 10.1080/22221751.2020.1745095
26. Long C., Xuc H., Shen Q., Zhang X., Fan B., Wang C., Zeng B., Li Z., Li X., Li H. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *Eur. J. Radiol.*, 2020, vol. 126: 108961. doi: 10.1016/j.ejrad.2020.108961
27. Lu X., Wang L., Sakthivel S.K., Whitaker B., Murray J., Kamili S., Lynch B., Malapati L., Burke S.A., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Villanueva J.M., Lindstrom S. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Emerg. Infect. Dis.*, 2020, vol. 26, no. 8, pp. 1654–1665. doi: 10.3201/eid2608.201246
28. Lu Y., Deng W., Liu M., He Y., Huang L., Lv M., Li J., Du H. Symptomatic Infection is associated with prolonged duration of viral shedding in mild coronavirus disease 2019: a retrospective study of 110 children in Wuhan. *Pediatric Infect. Dis. J.*, 2020, vol. 39, no. 7, p. e95-e99. doi: 10.1097/INF.0000000000002729
29. Maricic T., Nickel O., Aximu-Petri A., Essel E., Gansauge M., Kanis P., Macak D., Riesenberger S., Bokelmann L., Zeberg H., Meyer M., Borte S., Paabo S. A direct RT-qPCR approach to test large numbers of individuals for SARS-CoV-2. *medRxiv preprint*, 2020, June 26. doi: 10.1101/2020.06.24.20139501
30. Miller T.E., Garcia Beltran W.F., Bard A.Z., Gogakos T., Anahtar M.N., Astudillo M.G., Yang D., Thierauf J., Fisch A.S., Mahowald G.K., Fitzpatrick M.J., Nardi V., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Marble H.D., Ritterhouse L.L., Turbett S.E., Batten J., Georgantas N.Z., Alter G., Schmidt A.G., Harris J.B., Gelfand J.A., Poznansky M.C., Bernstein B.E., Louis D.N., Dighe A., Charles R.C., Ryan E.T., Branda J.A., Pierce V.M., Murali M.R., Iafate A.J., Rosenberg E.S., Lennerz J.K. Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological 1 COVID-19 diagnostics for patients presenting to the hospital. *FASEB J.*, 2020, vol. 34, no. 10, pp. 13877–13884. doi: 10.1096/fj.202001700RR
31. Pan Y., Zhang D., Yang P., Poon L.M., Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 4, pp. 411–412. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4
32. Salehi S., Abedi A., Balakrishnan S., Gholamrezanezhad A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review of imaging findings in 919 patients. *Am. J. Roentgenol.*, 2020, vol. 215, no. 1, pp. 87–93. doi: 10.2214/AJR.20.23034

33. Tahmasebi S., Khosh E., Esmailzadeh A. The outlook for diagnostic purposes of the 2019-novel coronavirus disease. *J. Cell Physiol.*, 2020, vol. 235, no. 12, pp. 9211–9229. doi: 10.1002/jcp.29804
34. van Kampen J.J.A., van de Vijver D.A.M.C., Fraaij P.L.A., Haagmans B.L., Lamers M.M., Okba N., van den Akker J.P.C., Endeman H., Gommers D.A.M.P.J., Cornelissen J.J., Hoek R.A.S., van der Eerden M.M., Hesselink D.A., Metselaar H.J., Verbon A., de Steenwinkel J.E.M., Aron G.I., van Gorp E.C.M., van Boheemen S., Voermans J.C., Boucher C.A.B., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., Geurtsvankessel C., van der Eijk A.A. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 267. doi: 10.1038/s41467-020-20568-4
35. Wang M., Wu Q., Xu W., Qiao B., Wang J., Zheng H., Jiang S., Mei J., Wu Z., Deng Y., Zhou F., Wu W., Zhang Y., Zhihua L., Huang J., Guo X., Feng L., Xia Z., Li D., Xu Z., Liu T., Zhang P., Tong Y., Li Y. Clinical diagnosis of 8274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan. *medRxiv preprint*, 2020, February 18. doi: 10.1101/2020.02.12.20022327
36. Weiss A., Jellingsoe M., Sommer M.O.A. Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*, 2020, vol. 58: 102916. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102916
37. WHO. Advice on the use of masks in the context of COVID-19. 2020. URL: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/temp/who-2019-ncov-ipc-masks-2020-4-eng.pdf?sfvrsn=20ec1cbf_2\(05.06.2020\)](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/temp/who-2019-ncov-ipc-masks-2020-4-eng.pdf?sfvrsn=20ec1cbf_2(05.06.2020))
38. Wikramaratna P.S., Paton R.S., Ghafari M., Lourenço J. Estimating the false-negative test probability of SARS-CoV-2 by RT-PCR. *Euro Surveill.*, 2020, vol. 25, no. 50: 2000568. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000568
39. Williams T.C., Wastnedge E., Allister G., Bhatia R., Cuschieri K., Kefala K., Fiona J.H., Johannessen I., Laurenson I.F., Shepherd J., Stewart A., Waters D., Wise H., Templeton K. Sensitivity of RT-PCR testing of upper respiratory tract samples for SARS-CoV-2 in hospitalised patients: a retrospective cohort study. *medRxiv preprint*, 2020, June 20. doi: 10.1101/2020.06.19.20135756
40. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 2020, vol. 581, no. 7809, pp. 465–469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x
41. Xie X., Zhong Z., Zhao W., Zheng C., Wang F., Liu J. Chest CT for typical coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing. *J. Radiology*, 2020, vol. 296, no. 2, pp. 41–45. doi: 10.1148/radiol.2020200343
42. Yang H., Lan Y., Yao X., Lin S., Xie B. Evaluation on the diagnostic efficiency of different methods in detecting COVID-19. *medRxiv preprint*, 2020, June 26, doi: 10.1101/2020.06.25.20139931
43. Yang W., Dang X., Wang Q., Xu M., Zhao Q., Zhou Y., Zhao H., Wang L., Xu Y., Wang J., Han S., Wang M., Pei F., Wan Y. Rapid detection of SARS-CoV-2. Using reverse transcription RT-LAMP method. *medRxiv preprint*, 2020, March 03. doi: 10.1101/2020.03.02.20030130
44. Yang W., Yan F. Patients with RT-PCR confirmed COVID-19 and normal chest CT. *J. Radiology*, 2020, vol. 295, no. 2: E3. doi: 10.1148/radiol.2020200702
45. Young B.E., Sean-Wei X.O., Kalimuddin S., Low J.G., Tan S.Y., Loh J., Ng O.-T., Marimuthu K., Ang L.W., Mak T.M., Lau S.K., Anderson D.E., Chan K.S., Tan T.Y., Ng T.Y., Cui L., Zubaidah S., Kurupatham L., Chen M.I.-C., Chan M., Vasoo S., Wang L.F., Tan B.H., Tzer R. Lin P., Jian V., Lee M., Leo Y.-S., Lye D.C. Epidemiologic features and clinical course of patients infected with SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 15, pp. 1488–1494. doi: 10.1001/jama.2020.3204
46. Yuan J., Kou S., Liang Y., Zeng J.F., Pan Y., Liu L. Polymerase chain reaction assays reverted to positive in 25 discharged patients with COVID-19. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 16, pp. 2230–2232. doi: 10.1093/cid/ciaa398
47. Zhou B., She J., Wang Y., Ma X. The duration of viral shedding of discharged patients with severe COVID-19. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, vol. 71, no. 16, pp. 2240–2242. doi: 10.1093/cid/ciaa451
48. Zhou R., Li F., Chen F., Liu H., Zheng J., Lei C., Wu X. Viral dynamics in asymptomatic patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 96, pp. 288–290. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.030
49. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., Xia J., Guo Q., Song T., He J., Yen H.L., Peiris M., Wu J. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, no. 12, pp. 1177–1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737

Авторы:

Куличенко А.Н., д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Саркисян Н.С., к.м.н., зав. отделом консультационно-профилактической работы, врач клинической лабораторной диагностики, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия.

Authors:

Kulichenko A.N., PhD, MD (Medicine), RAS Corresponding Member, Professor, Director of the Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Sarkisyan N.S., PhD (Medicine), Head of the Consulting and Preventive Work, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation.

ВТОРОЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОММЕНТАРИЙ К COVID-19 (год спустя)

О.И. Кубарь, М.А. Бичурина, Н.И. Романенкова

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В самом начале развития пандемии COVID-19, когда социальная уязвимость перед лицом глобальной инфекционной угрозы стала очевидна, нами была предпринята попытка провести первое целевое информирование по ключевому цивилизационному вопросу, затрагивающему роль этики в условиях чрезвычайных ситуаций эпидемического характера. Было осуществлено детальное изучение гуманитарного наследия управления пандемиями прошлого и сделан обзор действующих международных документов, посвященных вопросам нравственной составляющей поддержания общественного здравоохранения в период пандемий. В ходе сопоставления алгоритма нормативных и этических характеристик был проведен анализ соответствия правового регламента Российской Федерации мировому этическому стандарту. В настоящий период, год спустя от начала распространения глобальной эпидемической волны COVID-19, настало время практически оценить действенность идеологии этической приверженности управления и контроля эпидемическими катастрофами и объективно осмыслить возникшие медицинские и социальные конфликты, и прежде всего оценить их уровень, причины, последствия и возможность преодоления. Отдельно необходимо подчеркнуть, что данная работа не претендует стать так называемым «извлеченным моральным уроком COVID-19», а в действительности представляет собой реальную картину того, каким образом был учтен или не учтен многовековой исторический опыт работы медицинских, социальных и государственных служб в период пандемий различных инфекционных заболеваний и как была усвоена и применена уникальная истина этического наполнения управленческих решений и действий. Особое значение также имеет факт возможности публикации данной работы как продолжения нашего исследования по биоэтике пандемий на страницах столь авторитетного профильного журнала, что в полной мере позволяет сохранить целостность представлений о гуманитарной сущности противоэпидемических мероприятий, начиная от момента ведения конкретного пациента с инфекционной патологией и вплоть до масштабных мер по ликвидации управляемых инфекций. Комплексный и динамичный взгляд на необходимость поиска путей и характер преодоления этических конфликтов в ходе продолжающейся пандемии новой коронавирусной инфекции призван определить этический подход долгосрочных рекомендаций в сфере защиты общественного здоровья и обеспечить стабильность социального доверия в будущем.

Ключевые слова: социальная этика, пандемия COVID-19, глобальный конфликт интересов, защита общественного здоровья, гражданская свобода, ответственность, доверие.

SECOND ETHICAL COMMENTS TOWARDS COVID-19 (one year later)

Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I.

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. At the beginning of COVID-19 development, when social vulnerability in the face of the global infectious threat became obvious, we presented target information on a key civilizational issue — the role of ethics in epidemic emergencies. The compliance of RF legislation and the world ethical standards analyzed on based on the study of the humanitarian heritage of pandemic management and a review of existing international documents. Today, one year later, it is time

Адрес для переписки:

Кубарь Ольга Иосифовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-56. Факс: 8 (812) 232-92-17.
E-mail: okubar@list.ru

Contacts:

Olga I. Kubar
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-21-56. Fax: +7 (812) 232-92-17.
E-mail: okubar@list.ru

Для цитирования:

Кубарь О.И., Бичурина М.А., Романенкова Н.И. Второй этический комментарий к COVID-19 (год спустя) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 17–24. doi: 10.15789/2220-7619-SEC-1645

Citation:

Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. Second ethical comments towards COVID-19 (one year later) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 17–24. doi: 10.15789/2220-7619-SEC-1645

to practically evaluate the effectiveness of the ideology of ethical commitment and objectively comprehend the conflicts that have arisen, their causes and consequences. It should be emphasized that this work is not a so-called “moral lesson learned from COVID-19”, but representation of a real picture of how the centuries-old experience of former epidemics and pandemics was taken into account and the unique truth of the ethical content of management decisions and actions was accepted. It is particularly important to have a possibility to present this article as a continuation of our research topic on the bioethics of pandemics, on the pages of such an authoritative, specialized journal, which fully allows us to preserve the integrity of ideas about the humanitarian essence of anti-epidemic measures. This humanitarian parallel starts from the moment of managing a particular patient with infectious pathology until large-scale measures for eradication vaccine-preventable diseases. A comprehensive and dynamic look at the need to find ways and the nature of overcoming ethical conflicts during the ongoing pandemic of the new coronavirus infection could determine the ethical approach of long-term recommendations in the field of public health protection and ensure the stability of social trust in the future.

Key words: *social ethics, COVID-19 pandemic, global conflict of interest, protection of public health, civil liberty, responsibility, trust.*

В первом, инициальном этическом комментарии к COVID-19, представленном ранее в журнале «Инфекция и иммунитет» в марте 2020 года [7], были обозначены и проанализированы ключевые, руководящие и процедурные этические принципы, значимые для планирования работ в пандемию инфекционного заболевания с целью принятия этически выверенных решений [28].

Повторное обращение к оценке этической составляющей практики эпидемиологической ситуации, обусловленной COVID-19, логически обосновывает целесообразность проверки действенности рекомендованных стандартов и выявления непредвиденных этических конфликтов. Приоритетная цель данной работы направлена на поиск критериев объективного баланса между защитой общественного здоровья и обеспечением гражданских свобод. Достижение данной цели диктует необходимость выявления причин и последствий формирования этического кризиса на фоне COVID-19.

Фокус изучения ключевых этических позиций в условиях пандемии COVID-19

Сохранение методической целостности установочных подходов в ходе направленного мониторинга этической составляющей COVID-19 недостижимо без возвращения к основам идеологии международного реестра практических руководств, включающих этически значимые позиции, приверженность которым должна обязательно соблюдаться при управлении пандемией [3, 8, 16, 20, 21, 27, 29]. Как было представлено ранее, к четырем ключевым этически оправданным стандартам должны быть отнесены обязательства и ответственность уполномоченных на то органов за организацию помощи населению в период вспышек заразных болезней; возможность ограничительных мер по отношению к личной свободе в интересах общественного здоровья; концентрация, управление и справедливое распределение всех имеющихся ресурсов, а также солидарность и согласованность шагов на национальном и международном уровнях [28]. Следование вышеперечисленным

ключевым стандартам, в свою очередь, зиждется на исполнении целого ряда руководящих принципов принятия этических решений, которые, как было отмечено ранее, полноценно прописаны в законодательстве РФ и продемонстрировали оперативную тенденцию реагирования в ходе пандемии COVID-19 [7, 11, 12, 27]. Казалось бы, такой фундамент способен обеспечить равновесное осуществление базовых задач управления кризисной ситуацией. Однако последовательное и пристальное рассмотрение этапов развития пандемии убедительно демонстрирует существующий дефицит этического наполнения, повлекший развитие не только непредусмотренных, но и ожидаемых (казалось бы предсказуемых) рисков.

В рамках данной работы, по соображениям неопровержимой силы влияния трех ключевых обстоятельств, представляется наиболее значимым сфокусировать внимание на этической уязвимости истинно медицинской стороны эпидемиологического кризиса. Первая причина заключается в том, что ответственность и непосредственное исполнение обязательств по организации и осуществлению помощи населению в период пандемии COVID-19 выпали на медицинскую службу, определив передовую и наиболее стратегически опасную линию соприкосновения с инфекцией. Второй причиной, в определенной мере вытекающей из обозначенного выше факта, стала степень прямой вовлеченности и пораженности медицинских работников в пандемию, что привело к значимым потерям. Только по доступным данным, основанным на специальном исследовании ВОЗ и мемориальном «Списке памяти», уже в начале пандемии среди жертв COVID-19 доля смертей медицинских работников в мире оценивалась приблизительно в 10% от всех имеющихся жертв инфекции [1]. В Российской Федерации смертность медиков на период апрель–май 2020 года измерялась от 5 до 6,83%, в значительной мере превышая таковую в других странах: Иране — 1,59%; Италии — 0,65%; Великобритании — 0,53%; США — 0,48%; Испании — 0,27%; Германии — 0,23% [2, 5]. По данным другого информационного агентства, на начало сентября 2020 года

во всем мире от COVID-19 скончались более 7 тыс. медицинских работников. Из них наибольшее число жертв было зарегистрировано в Мексике — 1320 человек, США — 1077 человек, Бразилии — 634 человека и в Индии — 573 человека [13]. Возможная экстраполяция этих показателей в номинальные цифры утрат человеческих жизней медиков, с учетом реальной статистики сегодняшнего дня, не только глубоко ужасает по сути, но и иллюстрирует серьезную потерю основного и важнейшего ресурса борьбы с пандемией — медицинских кадров. Третьим элементом в цепи особого внимания к этике медицинской сущности COVID-19 следует обозначить роль научного и практического прорыва в системе медицинского управления и сдерживания COVID-19. Выбранный нами фокус изучения приобретает специальный акцент при сопоставлении с расчетами социально-экономического бремени COVID-19. Так, в РФ путем идентификации и оценки прямых медицинских, прямых немедицинских затрат, а также косвенных расходов в связи с развитием эпидемии коронавирусной инфекции было установлено, что в структуре ВВП страны более половины расходов составляют прямые немедицинские затраты (58,62%), косвенные расходы в связи с потерями ВВП составляют 40,65%, а прямые медицинские расходы составляют лишь менее 1% (0,74%) [6].

Особо необходимо подчеркнуть, что все вышесказанное, демонстрируя актуальность выбранной направленности изучения вопроса реализации ключевых этических позиций с акцентом на медицинский блок, ни в коей мере не умаляет значения всего комплекса логистических усилий политико-экономического характера, а в своей доминанте отражает глобальную и корневую суть проблемы.

Практика реализации ключевых этических позиций в условиях пандемии COVID-19

Начиная с момента объявления ВОЗ пандемии коронавирусной инфекции 11 марта 2020 года в соответствии с международными медико-санитарными правилами ВОЗ вступил в силу принцип ответственности любого государства — члена ВОЗ за уведомление об инфекционных заболеваниях и соблюдении мер по их локализации [3, 9]. В реальной практике событий это означало организацию экстренных мероприятий по ограничению распространения инфекции. На данном этапе критичным в плане этики исполнения стал лимит объективной информации о характере и скорости распространения вируса, отсутствие быстрых диагностических тестов и согласованного на национальном и международном уровнях разделения полномочий по передвижению потоков лиц.

Преодоление указанных недостатков в силу несинхронности планирования контрмер в реальном времени заняло неоправданно длительный период, что привело к глобальному распространению инфекции. С этических позиций имели место факты непропорционального к существующим рискам нарушения автономии и основных прав и свобод при изоляции людей, дискриминации при пересечении границ, например по признаку «гражданин/не гражданин» [26].

При этом очевидно, что формирование разумного и этически выдержанного противодействия должно включать обоснованный практикой прошлых эпидемий метод контроля, высокую гражданскую ответственность и оперативные волевые решения наряду с адекватной и взвешенной информацией. Принудительные меры в целом ряде случаев привели к обратным результатам за счет лимита общественного доверия и недостаточного сотрудничества структур управления и общества.

Исполнение обязательных полномочий общественного здравоохранения на первом этапе развития пандемии должно быть оценено в соответствии с общими эпидемиологическими, правовыми и этическими стандартами. К таковым следует причислить следующие: отдельные лица представляют значительный риск распространения опасного инфекционного заболевания; любые административные вмешательства должны быть направлены на возможность снижение риска; ограничительные средства применимы лишь в целях общественного здравоохранения и должны быть пропорциональны риску.

В глобальном масштабе прохождение данного этапа развития пандемии COVID-19 следует признать неудовлетворительным. Роковым итогом стало неудержимое и повсеместное распространение инфекции, которая тяжелым бременем обрушилась на системы здравоохранения всех вовлеченных в эпидемический кризис стран мира. Критическим моментом стремительной передачи инфекции среди населения явилось то, что была упущена концептуальная возможность мобилизации ресурсов общественного здравоохранения, необходимых для реализации научно обоснованных стратегий управления.

Особо остро этическая недостаточность сказалась при обеспечении полномочий по оказанию неотложной медицинской помощи. Среди главенствующих факторов, которые образуют неотъемлемую часть всех профессиональных кодексов и руководств по этике в медицине, следует выделить обязательства по оказанию медицинской помощи и сочувствие страданиям. Невозможность осуществления этих ключевых медицинских позиций стала одной из наиболее кризисных черт пандемии. В этой связи достаточно перечислить ведущие географические зоны кризиса: Бразилия, Великобритания, Индия, Испания, Италия, Китай, США и многие

другие, которые в различные периоды доминировали по числу жертв и неспособности управления ситуацией.

Среди ведущих проблем, в той или иной мере охвативших системы общественного здравоохранения всех стран, наиболее разрушительное значение имели проблемы сортировки больных, возникшие в условиях глубокого дефицита основных ресурсов: стационаров, оборудования, средств диагностики, лечения, медицинского и вспомогательного персонала, обладающего адекватными знаниями ведения больных с COVID-19 и средствами защиты [17]. Нельзя сказать, что вопрос сортировки пациентов в условиях интенсивной терапии при пандемии впервые возник при COVID-19. Исторически сортировка в условиях временно ограниченных ресурсов здравоохранения всегда являлась узким местом логистики, в связи с чем была предметом пристального изучения на опыте этических вызовов пандемий гриппа для создания протоколов сортировки пациентов, ориентированных на критерии «повышенной справедливости» [22]. Однако то, с чем пришлось столкнуться в период нынешней пандемии, перевернуло все существующие медико-этические устои, вплоть до невозможности следования клятве Гиппократова. Введенные возрастные и прогностические баллы по частоте сопутствующей патологии, тяжести респираторной недостаточности и вероятности выживания при длительной интубации и, помимо всего, сугубо коммерческие — страховые — различия как критерии оказания или не оказания медицинской помощи и, в конечном итоге, права на жизнь и достойную смерть, потрясли сознание человечества [17, 19, 23]. Примеры каскадных последствий ухудшения качества медицинской помощи и развития гуманитарных катастроф, возникающие по мере роста числа больных и увеличения дефицита возможностей, были широко и беспощадно представлены в СМИ. Учитывая постулат ВОЗ по определению состояния здоровья как «физического, психического и социального благополучия, а не просто отсутствия болезней или других физических нарушений», возникает обоснованная тревога и неудовлетворение деятельностью управленческих структур и мировых средств массовой информации по их освящению [31].

В этих условиях высокая морально деструктивная нагрузка легла непосредственно на работников здравоохранения и вспомогательный персонал медицинских учреждений. «Мрачной правдой» предстало состояние здравоохранения Италии — страны, которая до начала эпидемического кризиса представляла собой достаточно стойкую систему обеспечения медицинской помощи с показателем 3,2 больничных коек на 1000 человек (по сравнению с 2,8 в США) [23, 25]. В условиях столкновения с COVID-19 в Италии впервые была отмечена следующая последовательность ведущих вызовов, встав-

ших перед медиками — этика, логистика и терапия на переднем крае эпидемии. Своё состояние врачи Ломбардии (северной провинции Италии) охарактеризовали как нравственная «профессиональная агония», что побудило их обратиться за этической поддержкой в национальный совет по этике [18].

Все вышеуказанные факты однозначно объясняют, почему именно эта фундаментальная проблема — обеспечение этических ресурсов здравоохранения — является предметом приоритетного рассмотрения данной работы. Для адекватного исполнения профессиональной роли в сочетании с другими обязательствами, существующими по отношению к собственному здоровью, своей семье и другим обстоятельствам, в условиях кризиса в здравоохранении чрезвычайно важное значение приобретает соблюдение принципа взаимодействия и общественной поддержки тех, кто несет несоразмерное бремя по охране общественного здоровья и предпринимает все необходимые шаги по минимизации этого бремени. Помимо безусловной и однозначной ценности строительства госпиталей, улучшения качества индивидуальной защиты медиков и логистики, создания клинических руководств по ведению пациентов, разработки средств диагностики, лечения и профилактики, существует особая этическая парадигма сбалансированного сочетания мер обеспечения общественного здоровья, гражданских свобод и разделения тягот и бремени ответственности.

В этой связи следует специально остановиться на этически обоснованной структуре здравоохранения чрезвычайных ситуаций, способной уравновешивать оказание помощи, ориентированной на пациента с ответственностью, ориентированной на общество по обеспечению равенства и справедливости в распределении рисков, бремени и благ. Ответом на этическую перегрузку медицинских работников, столкнувшихся не только с дефицитом средств и доступа к лечению, но и с необходимостью несовместимого с медицинской профессией выбора кого лечить, а кого не лечить, стали оперативные этические исследования и разработки [24, 25]. В центре внимания этики общественного здоровья заложено определение трех кардинальных обязанностей предвидения и разрешения этических проблем при организации работ в системе здравоохранения при COVID-19 [25]. К ним относятся: обязанность планировать, защищать и направлять.

Первая обязанность — *планировать* — предусматривает способность руководителей здравоохранения предвидеть и обеспечивать решение предсказуемых этических проблем во время чрезвычайной ситуации. На деле это означает решение задач по разрешению конкретного конфликта. Суть конфликта заключается в существовании неопределенности и неуверенности

в том, как «поступать правильно» в клинической практике, когда профессиональные обязанности и моральные ценности противоречат друг другу. Планирование прогнозируемых этических проблем включает определение потенциальных решений и разработку инструментов их достижения.

Вторая, предложенная в качестве этической поддержки прямая обязанность руководителей здравоохранения — *защитить* медицинских работников и уязвимые группы населения, к которым в условиях кризисов, подобных COVID-19, должны быть приравнены все вспомогательные медицинские службы и привлеченные к работе в системе здравоохранения волонтерские резервы. На фоне ухудшающейся эпидемической обстановки клиницисты и вспомогательный медицинский персонал подвергаются максимальному риску в силу своей профессиональной деятельности, свидетельством чему стали ранее отмеченные физические и психологические потери в медицинской среде [1, 2, 13, 30]. Одним из направлений защиты может стать научно обоснованное наблюдение и идентификация инфекции, что предусматривает, в частности, поддержку лабораторного потенциала и диагностического тестирования для обеспечения быстрого подтверждения случаев заболевания, создание механизмов клинического надзора в медицинских учреждениях и оперативного информирования об эпидемическом профиле и распространении болезни. Выполнение таких практических мер защиты могло бы позволить избежать развития внутрибольничных инфекций со всеми вытекающими последствиями, вплоть до закрытия больниц.

Третья непреложная обязанность организаторов здравоохранения — *направлять*, то есть оперативно разрабатывать адекватные методические установки относительно характера и объема уровней помощи при непредвиденных обстоятельствах, а также четко прописывать стандарты ее оказания в кризисных ситуациях.

В совокупности эти три обязанности призваны реализовать повышенную социальную и профессиональную ответственность организаторов здравоохранения и разрешить противоречие между ориентацией этики общественного здравоохранения на равенство, справедливость и общественную безопасность, выражающуюся в равноправном распределении ограниченных ресурсов, и, с другой стороны, ориентацией клинической этики на пациента, выражающейся в уважении прав и предпочтений отдельных пациентов. К разработке таких стандартов в полной мере должны быть привлечены специалисты в области биоэтики, права, социологии, в том числе члены комитетов по этике всех уровней. Как предсказуемый этический конфликт, так и неопределенность решений, вызывающих моральные страдания, с которыми врачи и меди-

цинские бригады сталкиваются в непредвиденных обстоятельствах кризисных условий, требуют целенаправленной подготовки и поддержки со стороны всех институтов и служб этики.

Следовательно, справедливо отметить решающее значение состояния медицинской службы для способности общества противостоять чрезвычайным ситуациям в области общественного здравоохранения и, что необходимо особо выделить, восстанавливаться после них. Поддержка со стороны этической практики имеет решающее значение для добросовестности здравоохранения и достижения благополучия в вопросах сохранения долгосрочного здоровья населения. Эту функцию призваны выполнять оперативные руководства по этике, которые, в свою очередь, должны быть основаны на анализе существующих процессов, оперативно реагировать на «перегорание» медицинского персонала в условиях кризиса и быть нацелены на поиск компромиссных решений.

Специальной стороной оперативной этической поддержки процессов выхода из кризисной ситуации может служить солидарное объединение всех глобальных институтов и ассоциаций биоэтики, создавших в период пандемии постоянно действующие форумы в мировом информационном пространстве для обсуждения этических проблем и поиска оптимальных решений [17, 24]. Отечественным примером стала деятельность Совета по этике при МЗ РФ, направленная на решение актуальных вопросов этичности проведения исследований в условиях пандемии COVID-19 и экспресс-экспертизы разработок и регистрации лекарств и вакцин, когда имеет место поиск баланса решений в интересах всего человечества и оценки рисков, которые такие решения могут за собой повлечь [15]. Известно, что при пандемии COVID-19 остро возникла необходимость не только разработки новых лекарственных препаратов и вакцин, но и создания доказательной базы о новых показаниях применения существующих в медицине средств и методов. В клинических исследованиях имела место глобальная проблема смещения акцентов от приоритета здоровья индивидуума и прав испытуемых к учету интересов общества и человеческой популяции в целом. В качестве объяснений смягчения контрольных и регистрационных мер приводятся эпидемиологические аргументы и новизна вызовов. Однако ни то, ни другое не может служить доводом для пересмотра универсальной роли этической экспертизы по гарантии автономии, достоинства и соблюдения прав участников исследования. В порядке оперативных механизмов можно рассматривать правильную организацию и выполнение процедур, связанных с управлением рисками при проведении клинических исследований, где этическая составляющая является одной из самых важных, что повышает ответственность комите-

тов по этике всех уровней. Пандемия COVID-19 во всем мире обозначила тенденцию актуализации требований к стандартам клинических исследований [24]. В этом ключе можно рассматривать и постановление Правительства РФ от 3 апреля 2020 г. № 441 [15]. Однако единственным перспективным решением должна служить фундаментальная работа по созданию и перспективному включению в регуляцию клинических исследований специальных стандартных процедур этической экспертизы в чрезвычайных ситуациях, включая пандемии. При этом важным условием следует считать сопряженность с действующим блоком этических и правовых норм и достижение признания и согласия с глобальными нравственными ориентирами, выработанными человечеством. Непременным целевым стимулом должно служить устранение конфликта интересов всех мастей: национального, политического, финансового, корпоративного, религиозного и персонального. Однако практика реально демонстрирует, что текущее управление кризисом является абсолютно диспропорциональным по этическому признаку исключения конфликта интересов. Примеры такого развития событий очевидны в гонке мнений, скорости формирования и изменения клинических руководств и ситуации по представлению и продвижению средств и методов лечения и профилактики. Во всех названных процессах, с этической точки зрения, непреложной является доказанная научная и социальная целесообразность, включающая перспективу генерации научных знаний и совершенствование средств, необходимых для улучшения здоровья людей и общественного здравоохранения. При этом ответственность за то, чтобы предлагаемые исследования были наукоемкими и опирались на достаточную предварительную базу знаний, не накладывается только на разработчиков, а равномерно распределяется между всеми социально значимыми сторонами: исследователями, авторами, спонсорами, членами комитета по этике и уполномоченными органами здравоохранения. При изучении и продвижении вакцин, это положение имеет принципиальное значение и должно учитывать социальное значение исследования не только по факту новизны препарата, а также объективной оценки бремени инфекционной патологии в конкретной стране и в формате реального времени. Существующие методические руководства по этической экспертизе испытаний при стихийных бедствиях (землетрясениях, цунами, военных конфликтах и вспышках заболеваний) описывают конкретный механизм, позволявший решать важные задачи по оперативному накоплению знаний, формированию общественного доверия и преодолению практических трудностей в конкретных условиях. Все эти задачи должны быть тщательно сбалансированы с научной обоснованностью исследова-

ния и гарантией соблюдения прав участников и отчетностью перед общественностью. Особый смысл приобретает формат деловой этики как системы координат и общих правил поведения субъектов предпринимательской деятельности: например, в РФ предусмотрено следование кодексу надлежащей практики [4]. Общие этические аспекты продвижения лекарственных препаратов включают в себя открытость и достоверность информации о лекарственных препаратах и результатах их клинических исследований, взаимодействие с органами управления здравоохранением и другими организациями, отвечающими за обеспечение качества и доступности продукции для потребителей, а также вопросы благотворительности и обучающей деятельности. Абсолютно необходима взвешенная оценка рисков и этическое использование информации о безопасности и эффективности вакцин, основанной не на предполагаемой, а на доказательной базе открытых научному обществу данных. В маркетинговой коммуникации следует демонстрировать первенство научно обоснованных данных и этическое (четкое и грамотное по определению) информирование. Это не только вопрос имиджа компании, а, в первую очередь, вопрос успеха программ вакцинопрофилактики, который напрямую зависит от приверженности медицинской общественности, доверия гражданского общества и равной социальной доступности к вакцинации всего населения [14].

Сложившаяся ситуация по разработке вакцин к COVID-19 и их продвижению в глобальном аспекте демонстрирует поликонфликтность всех уровней, исторически знакомую в плане гонки за приоритетом, но противоречащую истинным параметрам нравственности и, что неоспоримо важно, — всем известным мировым достижениям в вопросах управления эпидемическим процессом и ликвидации инфекций. Ярким доказательством первенства объединения и солидарности усилий, способных принести ощутимый успех общечеловеческого уровня, является история борьбы с оспой, полиомиелитом и солидарные действия ВОЗ в сфере сотрудничества [10, 16].

Заключение

Резюмируя материалы, представленные в данном сообщении, можно констатировать, что любой разумный с точки зрения общественного здравоохранения ответ в условиях кризисной ситуации начинается с науки, морали и гражданской ответственности. Главным принципом и оценочным выводом исследования этической составляющей медицинского блока управления пандемией COVID-19 является обращение к фундаментальным нормам, классически включенным в формулу «лекарство не должно быть горше, чем болезнь». В конкретном понимании событий сегодняшнего дня это означает,

что должен быть тщательно предусмотрен и предельно исключен ущерб здоровью населения как в краткосрочной, так и долгосрочной перспективе кризиса в здравоохранении. Научная и практическая логика предусматривает первоочередную организацию работ по ретроспективному анализу всех имеющих место событий COVID-19. В оценочной политике необходимо использование наивысших объективных научных стандартов и обеспечение открытого и ответственного обсуждения результатов. Единственной и оправданной целью таких действий должно служить

создание комплекса руководящих мультидисциплинарных принципов и мер, способных обеспечить справедливое и успешное применение в текущих условиях продолжающейся пандемии и в будущем. Концептуальная целостность решений и действий на всех уровнях управления в чрезвычайной ситуации проверяется перспективной способностью создания новых и опережающих современный уровень условий для развития науки и этики в сочетании и единстве с приверженностью идеалам и нуждам гражданского общества.

Список литературы/References

1. Болдырев О. В России обсуждают высокую смертность от COVID-19 среди врачей // BBC News: русская служба. Июнь 2020. [Boldyrev O. In Russia high mortality from COVID-19 among physicians are discussed. *BBC News in russian*. June 2020. (In Russ.)] URL: <https://www.bbc.com/russian/features-53094577> (01.02.2021)
2. В России подтверждено только 40 смертей врачей от COVID-19 // Коммерсантъ: новости. Июль, 2020. [In Russia only 40 deaths from COVID-19 are confirmed. *Commersant: news*. July, 2020. (In Russ.)] URL: <https://www.kommersant.ru/doc/4400147> (01.02.2021)
3. Илесанми М.А. Пандемии и проблемы ограничения прав человека // Юрист. 2018. № 8. С. 59–65. [Ilesanmi M.A. Pandemic diseases and the issue of human rights restriction. *Jurist = Lawyer*, 2018, no. 8, pp. 59–65. (In Russ.)] doi: 10.18572/1812-3929-2018-8-59-65
4. Кодекс надлежащей практики Ассоциации международных фармацевтических производителей (AIPM). М.: 2019. 128 с. [Code of Practice (AIPM). *Moscow: 2019*. 128 p. (In Russ.)] URL: http://www.aipm.org/netcat_files/80/124/h_864109e0706201bd75c7a9196bb350cd
5. Козкина А., Френкель Д., Литаврин М., Шулаев Н. В России от коронавируса погибли не менее 186 медиков — смертность среди них в 16 раз выше, чем в других странах // Медиазона. Май, 2020. [Kozkina O., Frenkel D., Litavrin M., Shulaev N. More than 186 physicians died from coronavirus in Russia: mortality is at 16 times higher among them compared with other countries. *Mediazona*. May, 2020. (In Russ.)] URL: <https://yandex.ru/turbo/zona.media/s/article/2020/05/19/martyrology> (01.02.2021)
6. Колбин А.С., Белоусов Д.Ю., Гомон Ю.М., Балькина Ю.Е., Иванов И.Г. Социально-экономическое бремя COVID-19 в Российской Федерации // Качественная клиническая практика. 2020. № 1. С. 35–44. [Kolbin A.S., Belousov D.Yu., Gomon Yu.M., Balykina Yu.E., Ivanov I.G. Socio-economic burden of COVID-19 in the Russian Federation. *Kachestvennaja klinicheskaja praktika = Good Clinical Practice*, 2020, no. 1, pp. 35–44. (In Russ.)] doi: 10.37489/2588-0519-2020-1-35-44
7. Кубарь О.И. Этический комментарий к COVID-2019 // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 287–294. [Kubar O.I. Ethical comments on COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 287–294. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ECO-1447
8. Кубарь О.И., Бичурина М.А., Романенкова Н.И., Асатрян А.Ж. Этические принципы ликвидации инфекций // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 3. С. 205–212. [Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I., Asatryan A.G. Ethical principals of eradication of infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 205–212. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-205-212
9. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). 3-е изд. ВОЗ, 2016. 92 с. [International health regulations (2005). 3rd ed. *WHO*, 2016. 92 p. (In Russ.)] URL: <https://www.who.int/ihr/publications/9789241580496/ru>
10. Микиртичан Г.Л. Исторический аспект этико-правовых отношений в инфекционной патологии. В кн.: Этика инфекционной патологии / Под общ. ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. С. 8–40. [Mikirtichan G.L. Historical aspect of ethical and legal relations in infectious pathology. In: *Ethics of infectious pathology*. Ed. O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2014, pp. 8–40. (In Russ.)]
11. О временном ограничении въезда в РФ иностранных граждан и лиц без гражданства, в том числе прибывающих с территории Республики Беларусь, а также граждан Республики Беларусь: распоряжение Правительства РФ от 16 марта 2020 г. № 635-р. [On temporary restrictions on the entry into the Russian Federation of foreign residents and stateless persons, including those arriving from the territory of the Republic of Belarus, as well as citizens of the Republic of Belarus: Order of the Government of the Russian Federation No. 635-R of March 16, 2020. (In Russ.)] URL: <https://base.garant.ru/73751180>
12. О чрезвычайном положении: Федеральный конституционный закон от 30.05.2001 № 3-ФКЗ (ред. от 03.07.2016). [On the state of emergency: Federal constitutional law of 30.05.2001 No. 3-FKZ (ed. from 03.07.2016) (In Russ.)] URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_31866
13. Почему выгорают врачи. Хроника необъявленной волны COVID-19 в регионах России // Новая газета. Октябрь, 2020. [Why physicians are burning out. The chronicle of undeclared wave of COVID-19 in Russian regions. *Novaya Gazeta*. October, 2020. (In Russ.)] URL: <https://novayagazeta.ru/articles/2020/10/11/87470-pochemu-vygorayut-vrachi> (01.02.2021)
14. Сырочкина М.А. Этика продвижения вакцин. В кн.: Этика инфекционной патологии / Под общ. ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. С. 138–144. [Syrochkina M.A. Ethics of vaccine promotion. In: *Ethics of infectious pathology*. Ed. O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2014, pp. 8–40. (In Russ.)]

15. Хохлов А.Л., Полозова Е.А., Комиссарова В.А., Чудова Н.В., Цызман Л.Г. Риски, сопряженные с этическими аспектами проведения клинических исследований // Качественная клиническая практика. 2020. № 1. С. 61–68. [Khokhlov A.L., Polozova E.A., Komissarova V.A., Chudova N.V., Tsyzman L.G. Risks associated with the ethical aspects of conducting clinical trials. *Kachestvennaja klinicheskaja praktika = Good Clinical Practice*, 2020, no. 1, pp. 61–68. (In Russ.)] doi: 10.37489/2588-0519-2020-1-61-68
16. Этика инфекционной патологии. Под общ. ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. 116 с. [Ethics of infectious pathology. Ed. O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2014. 116 p. (In Russ.)]
17. Adams J.G., Walls R.M. Supporting the health care workforce during the COVID-19 global epidemic. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 15, pp. 1439–1440. doi: 10.1001/jama.2020.3972
18. Clinical ethics recommendations for admission to intensive care and for withdrawing treatment in exceptional conditions of imbalance between needs and available resources. Italian Society for Anaesthesia, Analgesia, Resuscitation, and Intensive Care. *March 13, 2020*.
19. COVID-19: obstetrics care centers for disease prevention and control. considerations for infection prevention and control of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in inpatient obstetric healthcare settings. May 20, 2020. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/inpatient-obstetric-healthcare-guidance.html> (01.02.2021)
20. Ethical guidelines in pandemic influenza, CDC. *Atlanta (USA): 2007*. 12 p.
21. Ethical issues in pandemic influenza planning. World Health Organization. URL: http://www.who.int/ethics/influenza_project/en (01.02.2021)
22. Gostin L.O., Hodge J.G. Reforming federal public health powers: responding to national and global threats. *JAMA*, 2017, vol. 317, no. 12, pp. 1211–1212. doi: 10.1001/jama.2017.1021
23. Gostin L.O., Hodge J.D. US Emergency Legal Responses to Novel Coronavirus. Balancing Public Health and Civil Liberties. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 12, pp. 1131–1132. doi: 10.1001/jama.2020.2025
24. Guidance on the management of clinical trials during the COVID-19 (Coronavirus) pandemic. Version 3 (28/04/2020). *Brussels: 2020*. 21 p. URL: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-10/guidanceclinicaltrials_covid19_en.pdf
25. Hick J.L., Hanfling D., Wynia M.K., Andrew T. Duty to plan: health care, crisis standards of care, and novel coronavirus SARS-CoV-2. *NAM Perspectives*, 2020, doi: 10.31478/202003b
26. Khan K., Eckhardt R., Brownstein J.S., Naqvi R., Hu W., Kossowsky D., Scales D., Arino J., MacDonald M., Wang J., Sears J., Cetron M.S. Entry and exit screening of airline travelers during the A(H1N1) 2009 pandemic: a retrospective evaluation. *Bulletin of the World Health Organization*, 2013, vol. 91, no. 1–6, pp. 368–376.
27. Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. Ethical consideration regarding COVID-19. *EC Microbiol., special iss.*, 2020, pp. 14–15.
28. Stand on guard for thee. Ethical considerations in preparedness planning for pandemic influenza. A report of the University of Toronto Joint Centre for Bioethics. *Toronto: 2005*. 27 p.
29. Stockpiling antivirals for pandemic influenza: the key ethical principles. Prepared by Ethics Subcommittee of the Advisory Committee to the Director. *CDC. November 28, 2007*.
30. Whelan A., Young G., Catanese V.M. Medical students and patients with COVID-19: education and safety considerations. March 5, 2020. *Washington: American association of medical colleges, 2020*. URL: <https://www.umassmed.edu/globalassets/office-of-communications/documents/role-of-medical-students-and-covid-191.pdf>
31. WHO remains firmly committed to the principles set out in the preamble to the Constitution. URL: <https://www.who.int/about/who-we-are/constitution> (01.02.2021)

Авторы:

Кубарь О.И., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; член Российского комитета по биоэтике (РКБ) при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО МИД РФ, Москва, Россия; экс-член Международного комитета по биоэтике (МКБ) ЮНЕСКО;

Бичурина М.А., д.м.н., зав. лабораторией этиологии и контроля вирусных инфекций; руководитель Субнациональной лаборатории ВОЗ по диагностике полиомиелита, кори и краснухи ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Романенкова Н.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций и Субнациональной лаборатории ВОЗ по диагностике полиомиелита ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kubar O.I., PhD, MD (Medicine), Professor; Leading Researcher, Department of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Member of the Russian Committee on Bioethics, Commission of the Russian Federation for UNESCO, Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russia; ex-member of the UNESCO International Committee on Bioethics;

Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Etiology and Control of Virus Infections and WHO Subnational Laboratories for Poliomyelitis, Measles and Rubella, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Romanenkova N.I., PhD (Medicine), Leading Researcher of the Laboratory of Etiology and Control of Virus Infections and WHO Subnational Laboratory for Poliomyelitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: УЧАСТИЕ В ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ И РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ. ЧАСТЬ II*

И.И. Долгушин, Е.А. Мезенцева

ФГБОУ Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Челябинск, Россия

Резюме. Поддерживающая гомеостатическая функция нейтрофильных гранулоцитов реализуется в физиологии разных тканей и систем организма. Нейтрофилы присутствуют вдоль всего женского репродуктивного тракта (ЖРТ), постепенно численно уменьшаясь в направлении от верхних отделов к влагалищу. При этом в разные фазы менструального цикла гормональные изменения регулируют как количество, так и активность нейтрофилов слизистой оболочки ЖРТ. Тканевые нейтрофилы являются важным источником протеолитических ферментов широкого спектра действия, таких как матриксные металлопротеиназы и эластаза, необходимых для ремоделирования внеклеточного матрикса, а также фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), необходимого для физиологического ангиогенеза ЖРТ. Во время беременности нейтрофилы децидуальной оболочки играют значимую роль в ремоделировании сосудов беременной матки и формировании иммунной толерантности матери по отношению к плоду. Приток нейтрофилов в слизистую оболочку кишечника, вызванный ее травматизацией или инфекцией, не только обеспечивает борьбу с патогенами, но и приводит к усилению пролиферации кишечных эпителиоцитов. Нейтрофильные гранулоциты генерируют протективные по отношению к эпителию сигналы и события, ставят на них «гипоксическую подпись», запуская транскрипцию когорты генов, кодирующих синтез муцинов, муцин-модифицирующих пептидов, антимикробных белков, β -дефензинов, что в конечном итоге способствует заживлению повреждений и восстановлению эпителиальной барьерной функции. Иницируемая нейтрофилами «воспалительная гипоксия» и последующая стабилизация гипоксия-индуцируемого фактора (HIF) в кишечных эпителиоцитах запускает механизмы самоограничения и разрешения воспаления, предотвращающие избыточное накопление нейтрофилов в просвете кишечника и развитие хронического воспалительного процесса. Нейтрофильные гранулоциты являются доминирующей популяцией иммунных клеток полости рта и составляют более 95% всех лейкоцитов, рекрутирующихся в десневую борозду и десневую жидкость. Нейтрофилы поддерживают физиологическое количество и стабильность состава симбиотической микрофлоры в зубных и десневых биопленках, противодействуя патогенным бактериям за счет фагоцитоза, дегрануляции и образования внеклеточных ловушек, и обеспечивают тем самым здоровье структур пародонта. На примере патогенеза пародонтита при дефиците адгезии лейкоцитов (LAD-1) показано, что развитие заболеваний пародонта при ряде врожденных нарушений количества и функций нейтрофильных гранулоцитов может быть связано не только с дефектом их защитно-эффекторной активности, но и с нарушением иммунорегуляторной функции тканевых нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, жизненный цикл, гомеостаз, репарация, кожа, легкие, ротовая полость, кишечник, женский репродуктивный тракт.

* Часть I опубликована в № 4 журнала «Инфекция и иммунитет» за 2020 г.

Адрес для переписки:

Мезенцева Елена Анатольевна
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64,
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 902 892-28-43.
E-mail: alena_mez_75@mail.ru

Contacts:

Elena A. Mezentseva
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64,
South-Ural State Medical University.
Phone: +7 902 892-28-43.
E-mail: alena_mez_75@mail.ru

Для цитирования:

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные гранулоциты: участие в гомеостатических и репаративных процессах. Часть II // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 25–41. doi: 10.15789/2220-7619-NGP-1258

Citation:

Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil granulocytes: participation in homeostatic and reparative processes. Part II // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 25–41. doi: 10.15789/2220-7619-NGP-1258

NEUTROPHIL GRANULOCYTES: PARTICIPATION IN HOMEOSTATIC AND REPARATIVE PROCESSES. PART II

Dolgushin I.I., Mezentseva E.A.

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. A supportive homeostatic function of neutrophilic granulocytes is accomplished in the physiology of diverse tissues and body systems. Neutrophils are found along the entire female reproductive tract (FRT), gradually declining in numbers from the upper parts towards the vagina. At the same time, both quantity and activity of FRT mucosal neutrophils are controlled by hormonal changes at different phases of menstrual cycle. Tissue neutrophils serve as an important source of broad-spectrum proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases and elastase necessary for extracellular matrix remodeling as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) required for physiological FRT angiogenesis. During pregnancy, decidual neutrophils play a prominent role in vascular remodeling in pregnant uterus as well as development of maternal-fetal immune tolerance. The influx of neutrophils into the intestinal mucosa due to its trauma or infection not only ensures defense against pathogens, but also leads to increased proliferation of intestinal epithelial cells. Neutrophilic granulocytes elicit signals and events protective for the epithelium by marking them with a “hypoxic signature” to trigger transcription of the gene set responsible for production of mucins, mucin-modifying peptides, antimicrobial proteins, β -defensins, ultimately contributing to lesion healing and recovery of epithelial barrier function. “Inflammatory hypoxia” initiated by neutrophils and subsequent stabilization of the transcription factor hypoxia-induced factor (HIF) in intestinal epithelial cells trigger mechanisms of self-limited and resolved inflammation, which prevent excessive accumulation of neutrophils in the intestinal lumen and development of chronic inflammatory process. Neutrophilic granulocytes dominate in the oral cavity mucosa and comprise more than 95% of total leukocyte population recruited into the gingival sulcus and gingival fluid. Neutrophils maintain physiological amount and stability of symbiotic microflora composition in dental and gingival biofilms, counteracting pathogenic bacteria via phagocytosis, degranulation and extracellular trap formation, thereby ensuring healthy state in periodontal structures. Finally, similar to some other congenital disorders affecting neutrophil quantity and functions it was shown that in case of leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1) pathogenesis of periodontitis may not only be associated with a defect in their protective effector activity, but also with altered immunoregulatory function of tissue neutrophils.

Key words: neutrophilic granulocytes, life cycle, homeostasis, repair, skin, lungs, oral cavity, intestines, female reproductive tract.

Нейтрофилы женского репродуктивного тракта

Поддерживающая гомеостатическая функция нейтрофилов установлена в физиологии женского репродуктивного тракта (ЖРТ). При этом нейтрофилы присутствуют вдоль всего ЖРТ, постепенно численно уменьшаясь в направлении от верхних отделов к влагалищу [96, 133]. Каждый из пяти анатомических участков ЖРТ (маточные трубы, эндометрий, эндоцервикс, экзоцервикс, влагалище) по-разному контролируется основными женскими половыми гормонами, эстрадиолом и прогестероном, которые, в свою очередь, модулируют выработку и секрецию различных иммунных факторов в разные фазы менструального цикла [32, 70, 87, 90, 134].

Заметное увеличение инфильтрации субэпителиальной стромы эндометрия нейтрофилами начинается у женщин в поздней секреторной (в предменструальной) фазе и достигает пика во время менструальной фазы цикла [14, 41, 49, 87, 136], когда их количество составляет от 6 до 15% от общего числа клеток эндометрия [14, 70, 80, 103]. Интенсивная миграция нейтрофилов связана с увеличением продукции хемокинов CCL2 (MCP-1) и CXCL8 (IL-8) и цитокинов IL-6 и TNF α стромальными и эпителиальными

клетками эндометрия [14]. Во время менструации нейтрофилы играют важную роль не только в деструкции эндометриальных тканей, но и в последующей их репарации [14, 49, 60, 69]. Так, на модели мышей было показано, что нейтрофилы, инфильтрирующие матку во время менструально-подобного кровотечения, являются основным источником матриксных металлопротеиназ (matrix metalloproteinase — ММП) ММП-7 и ММП-9 [59]. При этом концентрация ММП-9 заметно увеличивается во время отторжения эндометрия, участвуя в деградации компонентов внеклеточного матрикса, а ММП-7 — в период реэпителизации эндометрия [59, 70].

У женщин во время менструальной фазы экстравазальные нейтрофилы эндометрия секретируют ММП-9 (желатиназу В), участвующую в расщеплении компонентов внеклеточного матрикса и базальных мембран, таких как коллаген IV, коллаген V, эластин, желатин [128]. Кроме того, эндометриальные нейтрофилы во время менструации регулируют активность ММП и их синтез другими эндометриальными клетками [69]. Так, нейтрофильная эластаза способствует превращению неактивных форм ММП-2, ММП-3 и ММП-9 фибробластов стромы эндометрия в активные ферменты [69, 96]. Важно, что параллельно с выделением эластазы эндометриальные нейтрофилы во время

менструации продуцируют белок элафин [6, 55, 64], который является ее ингибитором и, таким образом, сдерживает чрезмерную активацию MMP и деградацию тканей, способствуя в конечном итоге успешной репарации эндометрия [64]. Элафин также обладает прямой антимикробной активностью и способствует противомикробной защите эндометрия при повреждении его эпителиального барьера во время менструации [64].

Физиологический ангиогенез, характерная особенность ЖРТ во время менструального цикла, поддерживается фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF). При этом одним из основных источников VEGF являются нейтрофилы, адгезированные на эндотелии сосудов эндометриального субэпителиального капиллярного сплетения, особенно во время пролиферативной фазы цикла при быстрым росте эндометрия [41, 87]. Вероятно, адгезия нейтрофилов приводит к их активации, дегрануляции и выбросу VEGF с последующим его связыванием с рецепторами на эндотелиальных клетках и прямой стимуляцией их пролиферации [41]. Нейтрофилы также вносят вклад в ангиогенез эндометрия благодаря своей способности повышать проницаемость сосудов вследствие действия на белки адгезивных контактов (adherens junctions) [125] и опять-таки за счет локального высвобождения VEGF, также известного как фактор проницаемости сосудов (vascular permeability factor — VPF) [19, 33, 34].

Состояние слизистой оболочки нижнего отдела ЖРТ также контролируется циклическими гормональными изменениями. Нейтрофилы и цервикально-влагалищная слизь защищают эпителиальные клетки от патогенных микроорганизмов и создают микросреду, которая стимулирует эндогенную микрофлору влагалища, одновременно сдерживая возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП) [104].

Для исследования механизмов, регулирующих динамику притока нейтрофилов в слизистую оболочку нижнего отдела ЖРТ, группой испанских ученых была использована вагинальная модель инфекции *C. albicans* у мышей [68]. При этом мышам производилась двусторонняя овариэктомия, а затем для имитации женского менструального цикла животным подкожно вводили эстрадиол (E2), уровень которого достигает максимума во время фолликулярной фазы, особенно к моменту овуляции, и прогестерон (P4), превалирующий в лютеиновой фазе [68]. Было установлено, что при высоком содержании E2, как во время фолликулярной фазы, количество нейтрофилов увеличивается в субэпителиальной строме влагалища, однако снижается в его просвете, достигая минимума

к моменту овуляции [68]. P4, наоборот, усиливает трансэпителиальную миграцию (ТЭМ) нейтрофилов в просвет влагалища [68]. Это связано с его способностью повышать продукцию хемокина CXCL1 эпителиоцитами влагалища даже в отсутствие инфекции и увеличивать его градиент во влагалищном содержимом. CXCL1 является лигандом для CXCR2 рецепторов нейтрофилов и побуждает последние мигрировать в вагинальный просвет, обеспечивая усиление антимикробной защиты. E2 же блокирует ТЭМ нейтрофилов за счет нарушения или реверсии градиента CXCL1, в результате чего последний в большем количестве накапливается в субэпителиальной строме, «останавливая» нейтрофилы и не способствуя их выходу в просвет влагалища [68]. Также E2 минимизирует уровень продукции эпителиоцитами влагалища IL-1 β и IL-8 [72]. Кроме того, E2 через эстрогеновые рецепторы альфа (ESR1) редуцирует экспрессию ключевых молекул, участвующих в ТЭМ нейтрофилов, на эпителиоцитах влагалища и эктоцервикса [104]. Так, E2 подавляет экспрессию CD47 на латеральной поверхности эпителиальных клеток, что тормозит межклеточный «проход» нейтрофилов и способствует их ретенции под эпителием [104]. E2 также снижает экспрессию и шеддинг CD44 на апикальном полюсе эпителиоцитов влагалища и эктоцервикса, способствуя удержанию тех нейтрофилов, которым все-таки удалось осуществить ТЭМ, на поверхности клеток эпителия и ингибируя их поступление во влагалищную жидкость [104].

Авторы предложили следующие объяснения различиям в действии половых гормонов по отношению к ТЭМ нейтрофилов во влагалище. Слизистая оболочка ЖРТ должна одновременно сочетать контроль над комменсальной микробиотой влагалища, транзиторно присутствующими сперматозоидами и элиминацией патогенной микрофлоры, передающейся половым путем. Во время фолликулярной и особенно овуляторной фазы эстрадиол максимально подавляет миграцию нейтрофилов во влагалищную жидкость, способствуя их суб- или супраэпителиальному удержанию, тем самым, вероятно, минимизируя потенциальный спермацидный эффект нейтрофилов и способствуя оплодотворению, задуманному природой, хотя и создавая кратковременную угрозу для заражения патогенной флорой. Прогестерон же увеличивает выход аккумуляированных нейтрофилов в просвет влагалища и их киллинговый потенциал, усиливая защиту от микробной инвазии и уже «ненужных» в случае наступления беременности сперматозоидов [50, 68, 104].

При исследовании слизи шейки матки у женщин репродуктивного возраста в течение менструального цикла было отмечено досто-

верное снижение концентрации нейтрофильной эластазы во время овуляции по сравнению с фолликулярной и лютеиновой фазами [120]. Эластаза — протеолитический фермент, локализующийся в первичных (азурофильных) гранулах нейтрофилов и обладающий как антимикробной активностью, так и способностью расщеплять многие белки макроорганизма, в частности эластин, коллаген, фибрин и другие [3, 4]. Уровень эластазы в шейной слизи коррелирует с активностью нейтрофилов, поэтому снижение концентрации фермента во время овуляции свидетельствует об уменьшении активности клеток в этот период [120]. Этот феномен опять-таки свидетельствует о том, что гормональные изменения во время овуляции способствуют удержанию нейтрофилов «в рамках дозволенного», не позволяя им проявлять агрессию по отношению к сперматозоидам и тем самым создавая благоприятные условия для оплодотворения и наступления беременности.

Ключевым событием процесса овуляции в яичниках является деградация внеклеточного матрикса с последующим разрывом стенки фолликула и выходом ооцита [10]. В данном процессе принимают участие ММР и их ингибиторы. При этом тканевые нейтрофилы являются одним из источников протеолитических ферментов широкого спектра действия для ремоделирования внеклеточного матрикса [10, 17]. Миграция нейтрофилов в преовуляторный фолликул связана с продукцией клетками стромы, теки и гранулезы ряда хемокинов, таких как IL-8 и GRO- α [10, 20]. После овуляции на месте лопнувшего фолликула формируется эндокринная структура, синтезирующая и секретирующая половые гормоны, в первую очередь прогестерон, называемая желтым телом [114, 119]. Желтое тело появляется в лютеиновой фазе каждого менструального цикла и инфильтрируется большим количеством нейтрофилов [87]. Их привлекает продуцируемый локально IL-8 для поддержки ангиогенеза [57]. Если беременность не наступает, желтое тело подвергается регрессу и лютеолизу [115]. При этом, как было установлено у самок крупного рогатого скота, экспрессия хемокинов IL-8, CCL8, CCL2, CXCL2 и молекул адгезии P-и E-селектинов на клетках эндотелия сосудов corpus luteum усиливается, что вызывает увеличение притока нейтрофилов, участвующих в его деградации и рассасывании [108, 119].

Во время нормальной беременности миелоидные клетки, в том числе нейтрофилы, проникают в децидуальную оболочку и миометрий не только для обеспечения защиты от патогенов, но и для участия в таких процессах, как имплантация эмбриона, формирование фетоплацентарного комплекса, регуляция толерантности матери к полуаллогенному плоду и индукция

родов [13, 50, 141]. При этом инфильтрация матки нейтрофилами отличается в разные периоды беременности. При исследовании лейкоцитов децидуальных тканей здоровых женщин, перенесших плановое прерывание беременности на сроках от 6-й до 20-й недели, с помощью проточной цитофлуориметрии было установлено, что во втором триместре беременности наблюдается рост числа CD45⁺CD66b⁺CD15⁺ децидуальных нейтрофилов (decidual neutrophils — dN), особенно интенсивно в течение 11–15-й недели с максимумом к 16–20-й неделе [12]. В то время как на 7-й неделе, то есть в первом триместре, число CD45⁺CD15⁺ dN составляло 2,73% от всех CD45⁺ лейкоцитов децидуи, к 19-й неделе их количество увеличивалось до 24,9% [12]. Иммуногистохимическое исследование с использованием в качестве маркеров нейтрофильной эластазы и CD66b подтвердило присутствие резидентных нейтрофилов в тканях децидуальной оболочки образцов 12–19-й недели беременности, то есть второго триместра [12]. При этом нейтрофилы обычно локализовались в дискретных участках стромы decidua basalis, часто рядом со спиральными артериями [12]. При сравнении экспрессии хемокиновых рецепторов у CD45⁺CD66⁺ dN и нейтрофилов периферической крови беременных женщин во втором триместре было установлено, что dN демонстрируют угнетение поверхностной экспрессии CXCL8-рецепторов CXCR1 (CD181) и CXCR2 (CD182) и усиление экспрессии CXCR3 (CD183), CXCR4 (CD184), CCR1 (CD191), CCR5 (CD195), являющихся рецепторами для CXCL10, CXCL12, CCL2–5 хемокинов соответственно [12]. Кроме того, dN проявляли экспрессию ангиогенных факторов VEGF-1, аргиназы 1 (ARG1) и CCL-2 в отличие от нейтрофилов, находящихся в просвете децидуальных кровеносных сосудов [12]. Интересно, что такие фенотипические характеристики, как высокий уровень экспрессии VEGF, CCL-2 и ARG1, характерны для опухолеассоциированных нейтрофилов (tumor-associated neutrophils — TAN) с проопухолевой активностью — N2 TAN, способствующих ангиогенезу опухоли и развитию иммуносупрессии [39, 107]. В связи с этим авторы обозначили выявленную субпопуляцию децидуальных нейтрофилов второго триместра беременности как «ангиогенные N2-подобные нейтрофилы» и сделали вывод, что они играют важную физиологическую роль в ремоделировании сосудов беременной матки и формировании материнской иммунной толерантности по отношению к полуаллогенному плоду [12]. Наиболее вероятно, что тканевые dN дифференцируются из нейтрофилов, рекрутированных из материнской циркуляции при участии CXCL8 (IL-8), продуцируемого стромальными и иммунными клетками деци-

дуи [12]. Возможно, что этому могут способствовать и другие плацентарные факторы, например микрочастицы синцитиотрофобласта [43].

В более ранних публикациях было также отмечено, что биоптаты плацент, взятых у здоровых женщин во время неосложненного самопроизвольного влгалищного родоразрешения или планового кесарева сечения, демонстрируют высокую аргиназную активность; при этом основной популяцией плацентарных клеток, экспрессирующих ARG1, являются CD15⁺CD14⁻ и CD15⁺CD14^{low} нейтрофилы [66]. Последствием высокой экспрессии аргиназы является истощение L-аргинина в среде, приводящее к снижению экспрессии CD3-дзета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR ζ) и, как следствие, к нарушению передачи активационных сигналов и развитию обратимой гипореактивности материнских Т-лимфоцитов [66]. Позже было установлено, что аргиназа-экспрессирующие плацентарные нейтрофилы представляют собой клеточную популяцию, которая при центрифугировании на градиенте плотности Histopaque выделяется как клетки с низкой плотностью (low-density granulocytes — LDGs) в отличие от «классических» нейтрофилов (normal-density granulocytes — NDGs) [111]. При этом LDGs плаценты по сравнению с NDGs демонстрируют более низкий уровень внутриклеточной аргиназы 1 при повышенной экспрессии мембранных CD63 и CD66b, что указывает на их активированный статус и дегрануляцию аргиназа-положительных азурофильных гранул [111].

Беременность — это уникальное состояние организма, при котором должна совмещаться относительная иммуносупрессия в отношении полуаллогенного плода и одновременно готовность иммунной системы эффективно отразить возможную инфекцию, последствия которой опасны не только для матери, но и для плода [44]. Недавние исследования показали, что нейтрофилы периферической крови матери при нормальной текущей беременности имеют характерный праймированный пронетотический фенотип и повышенную склонность к образованию NETs, которая нарастает по мере увеличения срока беременности, достигая пика к моменту родов [44, 50]. При этом нейтрофилы характеризуются изменениями в ядре, увеличением продукции активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS), экспрессии миелопероксидазы (MPO) и цитруллинации гистона H3, что, вероятно, обусловлено усиленной экспрессией PAD4, ключевыми событиями для эффективной генерации NETs [44]. Прогрессирующему усилению нетотической готовности по мере увеличения срока гестации, также как и росту количества нейтрофилов во время беременности, способствует грану-

лоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). При этом ХГЧ и эстрадиол способствуют формированию пронетотического состояния нейтрофилов, а прогестерон, наоборот, действует как антагонист. Антинетотический эффект прогестерона реализуется через подавление транслокации эластазы праймированных нейтрофилов из цитоплазмы в ядро и, как следствие, ее неспособности расщеплять молекулы гистонов, что является важным этапом для эффективного формирования NETs [44, 50]. Физиологическая беременность характеризуется не только ростом активности связанных с NETs молекулами, такими как PAD4, MPO и эластаза, но также и повышенной способностью нейтрофилов к фагоцитозу и дегрануляции [44, 50]. Таким образом, пронетотический статус нейтрофилов крови материнского организма демонстрирует их готовность к немедленной реакции при внедрении патогенов. При этом нужно помнить, что нарушение баланса, чрезмерная активация нейтрофилов и aberrантная продукция NETs при беременности способствуют развитию таких тяжелых осложнений, как преэклампсия, синдром потери плода и др. [43, 44, 50, 78].

Закономерным исходом неосложненной беременности являются своевременные роды — процесс, связанный с развитием физиологического воспаления в матке, в котором нейтрофилы также играют свою многоплановую роль [16, 43, 45, 81, 109, 110, 121]. При этом роды включают координацию двух основных событий: сокращения матки (миометрия) и ремоделирования цервикального внеклеточного матрикса [123].

Одним из ключевых цитокинов, опосредующих хемотаксис и активацию нейтрофилов, является IL-8. Во время своевременных родов у женщин в миометрии наблюдается резкое повышение экспрессии IL-8, что обуславливает приток нейтрофилов в матку [16, 45, 81]. Способность нейтрофилов выделять провоспалительные медиаторы и MMP предполагает их участие в дегградации внеклеточного матрикса и разрыве плодных оболочек во время родов [43, 45]. В моделях на мышах было показано, что инфильтрация децидуальных тканей нейтрофилами в большей степени усиливается во время раннего послеродового периода (первые 2–6 часов после родов), из чего авторами был сделан вывод, что нейтрофилы также играют важную роль в инволюции и ремоделировании миометрия после родов, что необходимо для защиты репродуктивного тракта от патогенов и для возможности наступления последующей беременности [43, 109].

Во время беременности шейка матки остается ригидной и закрытой, но перед родами она размягчается и укорачивается (созревает). Отсутствие нормального созревания в срок

связано с длительными родами и переносенной беременностью, тогда как преждевременное созревание является частью синдрома преждевременных родов [102]. Созревание шейки матки связано с ремоделированием коллагена и изменением содержания протеогликанов и воды [102]. Доказательства роли воспалительного ответа в целом и нейтрофилов в частности в обеспечении нормального созревания шейки матки неоднозначны, что может быть связано с различиями в участках тканей, из которых производится забор материала для биопсии, техникой и временем забора [124].

В ряде более ранних публикаций авторы отмечали важную роль нейтрофилов, мигрирующих в строму шейки матки и выделяющих протеолитические ферменты (ММР-8, ММР-9), в коллагенолизе, созревании и раскрытии шейки матки во время родов у человека [58, 92, 131]. Однако в последние годы доминирует точка зрения, что нейтрофилы, как у людей, так и у грызунов, более значимы в послеродовом ремоделировании и восстановлении шейечных тканей, чем в инициации созревания шейки матки в родах [43, 45, 46, 102, 122, 123, 124, 137]. Так, группой британских ученых было установлено, что уровень IL-8 резко возрастает как в строме, так и в шейечном эпителии у женщин после самопроизвольного влагалищного родоразрешения, а не во время созревания шейки матки, что ассоциируется с выраженным притоком нейтрофилов, экспрессирующих IL-8-рецепторы [102]. При этом не было обнаружено никакой корреляции между уровнем IL-8 и показателями зрелости шейки по шкале Бишопа и не было выявлено различий в количестве IL-8 у женщин с незрелой (с количеством баллов менее 4) и с созревающей (с количеством баллов более 4) шейкой матки ни в строме, ни в эпителии [101, 102]. Роль нейтрофилов в раннем послеродовом периоде может быть связана с их совместным с M1-макрофагами участием в реконструкции тканей шейки матки посредством клиренса продуктов деградации внеклеточного матрикса и продукции провоспалительных цитокинов, а также с защитой травмированного родового канала от инвазии патогенных агентов [112].

Нейтрофилы кишечника

В желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) млекопитающих обитают триллионы бактерий, вирусы и грибы, составляющие в совокупности микробиоту. При этом разные представители микробиоты могут специфически влиять на нейтрофилы. Например, у мышей сегментированные нитчатые (филаментные) бактерии (*segmented filamentous bacteria* — SFB) индуцируют дифференцировку CD4⁺ T-хелперов-17 (Th17)

в lamina propria слизистой кишечника. В свою очередь, Th17-клетки секретируют IL-17A, который активирует высвобождение хемокинов CXCL1 и CXCL2 из эпителиоцитов кишечника для привлечения и накопления нейтрофилов. Оказавшись в ткани, нейтрофилы за счет IL-23, индуцируемого SFB, через IL-23-рецептор сигнальные пути продуцируют IL-22 и антимикробные пептиды RegIII α , S100A8 и S100A9 [37]. Последние, с одной стороны, контролируют экспансию SFB в кишечнике, поддерживая баланс микрофлоры, и гиперпродукцию провоспалительного IL-17 по принципу отрицательной обратной связи [37]. С другой стороны, IL-22 благотворно влияет на барьерную функцию кишечного эпителия, усиливая пролиферацию, миграцию, слизееобразование эпителиоцитов и продукцию ими антимикробных пептидов RegIII β и S100A8 [142]. У мышей на модели колита, индуцируемого введением декстрансульфата натрия (*dextran sodium sulfate* — DSS), было установлено, что IL-22-продуцирующие нейтрофилы, рекрутируемые в ткани кишки, способствуют снижению тяжести течения заболевания и резолюции воспаления [142].

Оказавшись в тканях, нейтрофилы также могут принципиально изменить метаболизм слизистой оболочки, например значительно влияя на доступность кислорода для окружающих тканей [54]. В сравнении с другими слизистыми оболочками, кишечный эпителий пребывает в состоянии «физиологической гипоксии», что связано с выраженным градиентом кислорода между аноксичным просветом кишечника и хорошо кровоснабжаемой, а значит и оксигенированной lamina propria, на границе которых и находится эпителий [77, 138]. Одним из основных адаптационных механизмов по отношению к гипоксии на клеточном уровне является активация гипоксия-индуцируемого фактора (*hypoxia-inducible factor* — HIF) [77]. В условиях нормоксии HIF находится в эпителиоцитах в «разобранном» виде: его α -субъединица находится в цитоплазме и подавляется O₂-чувствительными ферментами, а β -субъединица локализуется в ядре [77]. В условиях гипоксии ферменты инактивируются, α -HIF транслоцируется в ядро, связывается с β -HIF, и формируется транскрипционно активный комплекс. HIF влияет на экспрессию генов, которые стимулируют альтернативные механизмы выработки энергии или усиливают поглощение кислорода, то есть регулируют выживаемость клеток и их метаболизм при низкой оксигенации [77].

В условиях нормы микрофлора толстого кишечника в основном представлена облигатными анаэробными бактериями, которые продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты, включая масляную, пропионовую и ук-

сусную [61]. Эти кислоты, особенно масляная, являются важным энергетическим субстратом для эпителиальных клеток кишечника и увеличивают потребление ими молекулярного O_2 , что приводит к местному истощению O_2 в той степени, которая стабилизирует HIF в эпителиоцитах на базовом уровне и способствует поддержанию барьерной функции эпителия [61]. В свою очередь колоноциты продуцируют CO_2 , необходимый для анаэробных бактерий, например для бактериоидов [36, 61, 138].

При инфекции и/или повреждении слизистой оболочки нейтрофилы мигрируют на поверхность кишечного эпителия. Трансэпителиальная миграция (ТЭМ) нейтрофилов в просвет кишечника включает в себя несколько стадий: 1) адгезия к базальной/базолатеральной поверхности клеток эпителия кишечника (КЭК); 2) миграция между КЭК от их базального полюса к апикальному (трансмиграция); 3) постмиграционные взаимодействия на апикальном полюсе КЭК [38, 74, 79]. Начальным этапом ТЭМ является связывание нейтрофилов с базальной/базолатеральной поверхностью кишечного эпителиоцита с помощью интегрина CD11b/CD18 (Mac-1) [38, 54, 74, 79, 93, 117, 118], что вызывает активацию протеаза-активируемых рецепторов (PARS) 1 и 2 КЭК и приводит к транзитному увеличению проницаемости эпителиального барьера и облегчению дальнейших этапов ТЭМ [93, 117]. Затем нейтрофилы переходят в межклеточное (параклеточное) пространство, где встречаются барьеры в виде десмосом (desmosomes — DMs), адгезивных (adherens junctions — AJs) и плотных контактов (tight junctions — TJs) [93, 117]. Нейтрофилы могут вызывать изменение экспрессии, интернализацию или дезинтеграцию белков, образующих межклеточные соединения [117]. Так, MMP-9 нейтрофилов вызывает расщепление десмоглеина, нарушая целостность десмосом и способствуя дальнейшей ТЭМ. Нейтрофильная эластаза расщепляет E-кадгерин, ключевой белок адгезивных контактов, вызывая нарушение последних, что, с одной стороны, повышает проницаемость эпителиального барьера и также усиливает ТЭМ [38, 74]. С другой стороны, эти же события индуцируют пролиферативные сигналы, важные для репарации эпителия [38, 74]. Миграция нейтрофилов через плотные контакты связана, в частности, со стимуляцией продукции ROS и провоспалительных цитокинов. Последние могут влиять на КЭК, индуцируя эндоцитоз белков плотных контактов клаудинов и окклюдина, снижая экспрессию адгезивной молекулы JAM-A, вызывая изменения цитоскелета. Все эти события опять-таки, с одной стороны, компрометируют эпителиальный барьер [74, 79,

93]. С другой стороны, провоспалительные цитокины также стимулируют синтез медиаторов, способствующих восстановлению гомеостаза слизистой и укреплению барьера [74]. Так, например, IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ промотируют повышение экспрессии и активности серин/треонин киназы SK2 в КЭК, что способствует их пролиферации и миграции, защищает от цитокин-индуцированного каспаза-опосредованного апоптоза и, таким образом, потенцирует эффективную регенерацию эпителия [65, 74].

Преодолев плотные контакты, нейтрофилы оказываются в конечной точке своего пути — на апикальной поверхности КЭК, удерживаясь на ней CD11b/CD18-ICAM-1-зависимым способом. При этом экспрессия ICAM-1 на КЭК значительно увеличивается при ТЭМ нейтрофилов [79, 117, 118]. Связывание нейтрофилов с ICAM-1 кишечных эпителиоцитов индуцирует реорганизацию актинового цитоскелета КЭК, что приводит к сокращению клеток, повышению эпителиальной проницаемости и ТЭМ нейтрофилов [117, 118]. При этом взаимодействие вышедших на просветную поверхность эпителия нейтрофилов с ICAM-1 усиливает их способность мигрировать как через слой муцина, так и вдоль апикальной мембраны эпителия, позволяя, вероятно, более точно искать и устранять причину воспаления [118].

Возникает вопрос, как вообще возможны взаимодействия нейтрофилов с апикальным полюсом КЭК в пространстве, где «рекой» двигается поступившая в ЖКТ пища и огромные количества микробов, которые могут «снести» мигрировавшие клетки. Однако микроанатомия толстой кишки позволяет удерживать мигрировавшие нейтрофилы в пределах трубчатых структур, называемых криптами, которые располагаются перпендикулярно просвету и глубоко проникают в слизистую оболочку. При этом нейтрофилы в основном собираются в основании крипт, которое защищено от потока пищи и, как было показано, относительно стерильно по сравнению с просветом [93]. С одной стороны, скопления больших количеств нейтрофилов в криптах служат гистологическим маркером воспаления с образованием крипт-абсцессов [38, 79]; с другой стороны, миграция нейтрофилов в просвет кишечника и их связывание с рецепторами на апикальной мембране КЭК является важной частью врожденного иммунитета и генерирует протективные по отношению к эпителию сигналы и события [54, 116].

Установлено, что связывание CD11b/CD18 нейтрофилов с ICAM-1 на апикальной мембране КЭК приводит к уменьшению апоптоза и удлинению срока жизни нейтрофилов в просвете кишечника, что свидетельствует об их «нуж-

ности» в течение длительного времени [116]. Эта «полезность» нейтрофилов может быть обусловлена не только их борьбой с патогенами, но и помощью в заживлении повреждений. Взаимодействие нейтрофилов с ICAM-1 запускает Akt-зависимую активацию β -катенин-сигнального пути КЭК, усиливая пролиферацию эпителиоцитов [116]. Полученные данные свидетельствуют о том, что подавление рекрутирования нейтрофилов в просвет кишечника в качестве противовоспалительного лечения не может быть оптимальным подходом, поскольку это может привести к отсутствию восстановления эпителиальной барьерной функции [116].

Оказавшись на просветной поверхности КЭК, нейтрофилы активно высвобождают 5'-АМФ, который превращается в аденозин с помощью апикально экспрессируемого КЭК фермента эктонуклеотидазы (CD73), что приводит к накоплению внеклеточного аденозина [38, 54, 74, 79]. Аденозин, взаимодействуя с Ado-рецепторами КЭК, индуцирует усиление секреции хлоридных электролитов, а значит и воды в просвет кишечника. С одной стороны, данный процесс является основой секреторной диареи, представляющей собой серьезную проблему у людей с воспалительными заболеваниями кишечника [38, 74, 79, 93]. Но с другой стороны, этот физиологический ответ, как предполагают, служит «промывочным механизмом» для удаления токсических веществ и бактерий, ассоциированных со слизистой оболочкой, и является частью врожденного иммунитета [54, 74, 93]. Кроме того, связывание аденозина с апикально экспрессируемыми Ado-рецепторами на КЭК повышает в последних полимеризацию актина, что усиливает барьерную функцию эпителия. Учитывая предшествующее транзитное повышение проницаемости эпителия на разных этапах ТЭМ нейтрофилов, аденозин, высвобождаемый ими, дает «запечатывающий» сигнал эпителиальным плотным контактам, и нейтрофилы как бы «закрывают за собой дверь», что играет важную роль в разрешении воспаления слизистой оболочки [54, 93].

Еще одним последствием аккумуляции нейтрофилов на апикальной поверхности КЭК является их активация и потребление больших количеств молекулярного O_2 через NADPH-оксидазный респираторный взрыв. При этом, с одной стороны, образуются мощные антимикробные агенты — активные формы кислорода; с другой стороны, происходит кислородное истощение окружающих тканей и развитие «воспалительной гипоксии» [21]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что активно мигрирующие нейтрофилы оставляют на окружающих эпителиальных клетках «гипоксическую подпись», или транскрипционный импринтинг, что про-

является, в частности, в виде стабилизации HIF в эпителиоцитах [21, 54]. HIF запускает в КЭК транскрипцию когорты генов, кодирующих синтез муцинов, муцин-модифицирующих пептидов, антимикробных белков, β -дефензинов, что в конечном итоге стимулирует реституцию эпителия, восстановление его барьерной функции и приводит к разрешению острого воспаления [21, 54, 77]. Можно предположить, что активация в мигрировавших нейтрофилах NADPH-оксидазного комплекса и развитие воспалительной гипоксии создают благоприятные условия для функционирования анаэробной кишечной микрофлоры. Однако нужно учитывать, что в условиях нормы микробиота толстого кишечника в основном (> 90%) представлена облигатными анаэробными бактериями типов *Bacteroidetes* (класс *Bacteroidia*) и *Firmicutes* (класс *Clostridia*) и только около 0,1% приходится на факультативных анаэробов, включая представителей семейства *Enterobacteriaceae* [130, 132]. В условиях воспаления продукция нейтрофилами, а также кишечными эпителиоцитами активных форм кислорода и азота и их выделение в просвет кишечника приводит к повышенному образованию нитратов, тетрационатов, S-оксидов и N-оксидов. В отличие от облигатных анаэробов, факультативные анаэробы, например представители *Enterobacteriaceae*, могут использовать перечисленные соединения в качестве акцепторов электронов при анаэробном дыхании за счет наличия ферментов редуказ. Это может привести к усиленному размножению в кишечнике таких бактерий, как *E. coli*, *S. Typhimurium* и др., способствуя развитию дисбактериоза [138].

На апикальном полюсе КЭК, кроме удерживающих нейтрофилы молекул ICAM-1, экспрессируются и антиадгезивные рецепторы CD55 (DAF), которые, взаимодействуя с CD97 нейтрофилов, стимулируют клиренс эпителиально-связанных нейтрофилов [38, 54, 117]. Подобно CD55, эпителиально-экспрессируемый CD44 также облегчает отщепление нейтрофилов по окончании ТЭМ [117]. При этом в условиях *ex vivo* в человеческих клетках линии T84 (из карциномы толстого кишечника) было установлено, что по мере нарастания гипоксии экспрессия ICAM-1 остается стабильной и не меняется, в то время экспрессия CD44 является HIF-1-индуцированной и значимо возрастает [73]. Полученные данные свидетельствуют о том, что индуцируемая нейтрофилами воспалительная гипоксия и последующая стабилизация HIF в КЭК запускает механизмы самоограничения и разрешения воспаления, предотвращающие избыточное накопление нейтрофилов в просвете кишечника и развитие хронического воспалительного процесса.

Таким образом, в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, которая постоянно подвергается воздействию различных микробных и немикробных агентов, быстрая мобилизация нейтрофилов в очаг инфекции/повреждения имеет решающее значение для эффективной индукции успешных адаптивных иммунных реакций и клиренса патогенов. Хотя чрезмерная инфильтрация и накопление нейтрофилов могут ассоциироваться с дефектами барьерной функции и травматизацией эпителия слизистой оболочки, что наблюдается при таких воспалительных заболеваниях кишечника, как болезнь Крона или язвенный колит, транзитное нахождение нейтрофилов на апикальной мембране КЭК положительно влияет на функцию эпителия, иницируя его репарацию, и нормальной микробиоты, способствуя сохранению мукозального гомеостаза и снижению тяжести течения заболевания [21]. Для защиты от патогенов, эффективного разрешения воспаления, восстановления барьерной функции и реституции эпителия крайне важен баланс между мобилизацией, удержанием и клиренсом нейтрофилов в поврежденных участках слизистых оболочек [117].

Нейтрофилы ротовой полости

Слизистая оболочка ротовой полости находится под постоянным влиянием огромного количества микроорганизмов и регулярно испытывает механические воздействия, связанные с жеванием и гигиеническими процедурами. Оральная экосистема характеризуется взаимодействием между ротовой микробиотой, компонентами слюны и факторами иммунной системы [98, 99]. По данным разных авторов, разнообразие бактерий, составляющих микробиоту ротовой полости, составляет от 700 до 1000 видов [7, 9, 30, 94, 129, 139]. При этом микроорганизмы демонстрируют специфический тропизм в отношении различных анатомических поверхностей полости рта, поэтому зубы, десны, десневые борозды, слизистая языка, щек, твердого и мягкого неба имеют выраженные отличия в составе населяющих их микробных сообществ [7, 30, 76].

Следует сказать, что на сегодняшний день отсутствует четкое определение понятия «оральные нейтрофилы», поскольку разные исследователи обозначают этим термином клетки, полученные с использованием неодинаковых методов отбора проб из различных ниш ротовой полости: слюны, десневой жидкости, тканей слизистой оболочки. Этим можно объяснить некоторые расхождения, а иногда и противоречия в полученных данных о свойствах и функциональной активности оральных ней-

трофилов [98]. Однако большинство ученых сходятся в одном: именно нейтрофильные гранулоциты являются доминирующей популяцией иммунных клеток полости рта [35, 42, 67, 97, 98, 99]. Кроме того, в последние годы появились публикации, авторы которых предполагают, что оральные нейтрофилы — это клетки, отличающиеся от периферических нейтрофилов по ряду фенотипических признаков, которые они приобретают во время процесса миграции [35, 88, 98]. При этом предлагается считать, что нейтрофилы здоровой полости рта находятся в промежуточном, паравоспалительном состоянии в отличие от высокоактивных провоспалительных нейтрофилов, появляющихся при хронических заболеваниях пародонта [35].

Мигрирующие в ротовую полость нейтрофилы отвечают за обеспечение здоровья пародонта [99, 127]. К пародонтальным структурам относятся десна, периодонтальная связка, корневой цемент и костная ткань альвеолы [2, 98]. Десневая борозда (щель) — это уникальный анатомический участок, окруженный твердыми тканями зуба с одной стороны и мягкими тканями с другой. Около 700 видов бактерий могут колонизировать десневую щель [56]. Эпителий десен образует барьер между бактериями зубного налета и глубже лежащими тканями, обеспечивая первую линию защиты за счет физических, химических и иммунологических факторов [56]. Последние представлены клетками иммунной системы. Нейтрофилы составляют более 95% всех лейкоцитов, рекрутирующихся в десневую борозду и десневую жидкость, и формируют «защитную стену» между ассоциированной с зубом субгингивальной микробной биопленкой и соединительным эпителием [22, 29, 51, 53, 83, 100, 127]. Наличие нейтрофилов в клинически здоровой слизистой десны отличает ее от других слизистых оболочек организма [31, 56].

У здорового человека направленной миграции нейтрофилов из кровеносных сосудов в десневую борозду способствует скоординированный градиент таких хемокинов и молекул адгезии, как IL-8 (CXCL8), ICAM-1 и E-селектин, экспрессируемых клетками соединительного эпителия [22, 23, 25, 51, 56, 62, 86]. Примерно 30 000 человеческих нейтрофилов совершают такое «путешествие» ежеминутно [83]. Исследование на мышах показало, что рекрутирование нейтрофилов в ткани пародонта полностью зависит от хемокинового рецептора CXCR2 (CXCR2), который реагирует на специфические для нейтрофилов хемоаттрактанты CXCL1 и CXCL2 (мышинные аналоги IL-8) [51, 140]. При этом экспрессия CXCL1 и CXCL2 клетками соединительного эпителия происходит и в отсутствие оральной микрофлоры

ры у безмикробных (germ-free) мышей. Однако число рекрутированных нейтрофилов в соединительный эпителий пародонта значительно увеличивается при колонизации полости рта комменсальными бактериями за счет выраженной активации последними эпителиальной экспрессии CXCL2 [47, 127, 140].

В других исследованиях на животных было также установлено, что клетки соединительного эпителия конститутивно экспрессируют ICAM-1, IL-1 β , кератиноцит-производный хемокин (keratinocyte-derived chemokine — KC; аналог человеческого IL-8) и макрофагальный белок воспаления 2 (macrophage inflammatory protein-2 — MIP-2) как у обычных, так и у безмикробных (germ-free) мышей [40, 86, 126]. При этом уровень экспрессии хемокинов KC и MIP-2 повышается в присутствии бактериальной микрофлоры, что приводит к усилению притока нейтрофилов [40]. Авторы отметили, что ключевым фактором в миграции нейтрофилов в соединительный эпителий является взаимодействие ICAM-1 эпителиоцитов и лимфоцитарного функционально ассоциированного антигена-1 (lymphocyte-function associated antigen-1 — LFA-1) мембраны нейтрофилов [40]. Наличие молекул ICAM-1 также на эндотелиоцитах и фибробластах, расположенных под соединительным эпителием в тканях десны, может «проложить путь» гранулоцитам в эпителий [86]. Полученные в моделях на животных результаты, с одной стороны, свидетельствуют о способности оральной микробиоты модулировать реакции врожденного иммунитета для поддержания гомеостаза полости рта [127, 140]. С другой стороны, конститутивный характер экспрессии молекул адгезии, хемокинов и цитокинов соединительным эпителием может отражать потребность эпителиоцитов в привлечении нейтрофилов для выполнения функций, выходящих за рамки контроля над микробиотой [83].

Рекрутированные в ротовую полость нейтрофилы регулируют количественный и качественный состав микробных сообществ оральных биопленок человека. Образование последних состоит из нескольких фаз. В первые минуты после чистки зубов на поверхности эмали формируется зубная пелликула, тонкая пленка из различных химических веществ, компоненты которой служат рецепторами для бактерий — первичных колонизаторов, представленных преимущественно аэробными или факультативно анаэробными грамположительными кокками. Адгезия последних приводит к последующей коадгезии фузобактерий и вторичных колонизаторов, в основном анаэробных грамотрицательных бактерий [7, 8]. У здорового человека нейтрофильные гранулоциты «патрулируют» десневую борозду и поддерживают

физиологическое количество и стабильность состава симбиотической микрофлоры в зубных и десневых биопленках, противодействуя патогенным бактериям за счет использования своих основных «видов оружия» в виде фагоцитоза, дегрануляции и образования внеклеточных ловушек [62, 127]. Важными защитными факторами десневой жидкости, продуцируемыми нейтрофилами, являются антимикробный пептид LL-37 и дефензины [56, 127]. Регулирующее гомеостаз ротовой полости значение нейтрофилов подтверждается следующими наблюдениями: патологические состояния, характеризующиеся отклонениями в количестве или функциях нейтрофильных гранулоцитов, включая хроническую/циклическую нейтропению, синдром дефицита адгезии лейкоцитов, синдром Папийона–Лефевра, синдром Чедиака–Хигаси, сопровождаются развитием тяжелых агрессивных форм пародонтита [22, 51, 53, 56, 62, 89, 127]. Доминирующим фактором в патогенезе пародонтита являются количественные и качественные изменения микробиоценоза десны и зубного налета [1]. «Тремя китами» микрофлоры, связанной с развитием воспалительных заболеваний пародонта, признаны *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* [15, 62, 127].

P. gingivalis, грамотрицательная анаэробная палочка, считается «краеугольным камнем» в развитии пародонтита [48, 52, 62, 127]. Эта бактерия использует различные механизмы для дестабилизации нейтрофильного гомеостаза ротовой полости [62]. Одним из основных способов, которым *P. gingivalis* манипулирует нейтрофилами, является процесс локального хемокинового паралича, развивающегося прежде всего за счет подавления бактерией синтеза IL-8 клетками десневого эпителия [26, 127]. Кроме того, ряд бактериальных продуктов *P. gingivalis*, например янтарная кислота, оказывают прямое иммобилизирующее действие на нейтрофилы человека [91, 127].

T. denticola, грамотрицательная анаэробная спирохета, также угнетает хемотаксис нейтрофилов, подавляя секрецию IL-8 эпителиальными клетками десны и вызывая деграцию данного хемокина [18, 27, 48, 62, 127]. Кроме того, основной белок наружной мембраны (major outer sheath protein — Msp) *T. denticola* модулирует сигнальные пути нейтрофилов, участвующие в регуляции изменений цитоскелета, что приводит к нарушению подвижности нейтрофилов, их миграции, адгезии, фагоцитирующей способности [11, 62, 75, 95, 127]. Дентилизин, еще один фактор вирулентности *T. denticola*, усиливает генерацию ROS в нейтрофилах и способствует высвобождению из них MMP-9, что ведет к дополнительному разрушению тканей пародонта

и поддержанию хронического воспаления [127, 135]. При этом сама трепонема, несмотря на свой строго анаэробный статус, способна выживать в присутствии ROS [106, 127]. Таким образом, представители микробиоты при пародонтите пытаются всячески избежать антимикробного воздействия нейтрофилов и перенаправить мощный потенциал этих клеток по пути агрессии в отношении тканей организма хозяина, используя при этом продукты деградации последних в качестве источника питательных субстратов [127].

В 2014 г. были опубликованы новые данные о роли нейтрофилов в патогенезе пародонтита у пациентов с дефицитом адгезии лейкоцитов 1 типа (leukocyte adhesion deficiency type 1 — LAD-1), полученные группой американских и немецких ученых [85]. LAD-1 — первичный иммунодефицит, связанный с мутациями, приводящими к нарушению экспрессии молекул CD18 β 2-интегринов и, как следствие, к дефектам адгезии и миграции нейтрофилов в ткани, и сопровождающийся развитием нейтрофилии, тяжелых рецидивирующих инфекций кожи и слизистых и раннего агрессивного пародонтита [53, 71, 85, 105]. При этом классический взгляд на развитие пародонтита с разрушением костной ткани у пациентов с LAD-1 базируется на неспособности нейтрофилов мигрировать и осуществлять надзор за пародонтит-индуцирующей микрофлорой [24, 28, 53, 63, 89]. Авторы же изменили этот традиционный постулат и продемонстрировали новую причинно-следственную связь в патогенезе тяжелого пародонтита, используя клинические данные пациентов с LAD-1 и данные, полученные на модели LFA-1 (CD11a/CD18)-дефицитных мышей [85]. Согласно полученным авторами результатам, ключевым фактором в развитии LAD-1-пародонтита с разрушением костной ткани является гиперпродукция провоспалительного цитокина IL-17 CD3⁺CD8⁻CD56⁻CD γ δ ⁻ Т-лимфоцитами (CD4⁺ Th17) в тканях десны, связанная с дисрегуляцией оси IL-23-IL-17 нейтростата [85]. В норме, при отсутствии дефекта адгезии и миграции, вышедшие в ткани нейтрофилы подвергаются апоптозу и последующему эффероцитозу макрофагами и дендритными клетками, что приводит к снижению последними секреции IL-23, который в свою очередь контролирует экспансию Th17 и продукцию ими IL-17 [53, 84, 113]. В случае же LAD-1 невозможность экстравазации и тканевая нейтропения приводят к нарушению регуляторной роли нейтрофилов в отношении оси IL-23-IL-17. Кроме того, бактериальные продукты оральной микробиоты вносят свой дополнительный вклад в стимуляцию продукции IL-23 и IL-17 [85]. Гиперсекреция IL-17 приводит к разви-

тию выраженного воспаления и резорбции альвеолярной костной ткани вследствие активации остеокластов [84]. Образующиеся при этом продукты распада тканей являются питательным субстратом для дисбиотической пародонтит-поддерживающей микрофлоры, компоненты которой в свою очередь усиливают воспаление и деструкцию, дополнительно стимулируя ось IL-23-IL-17 в отсутствие сдерживающего влияния нейтрофилов [53, 85]. Тот факт, что, с одной стороны, LAD-1-пародонтит не поддается лечению антибиотиками и/или механическим удалением зубной биопленки, но, с другой стороны, применение моноклональных анти-IL-17- и анти-IL-23-антител приводит к снижению общего числа бактерий пародонта у LFA-1 (CD11a/CD18)-дефицитных мышей [53, 85], доказывает, что высокая бактериальная нагрузка при LAD-1-пародонтите обусловлена IL-23/IL-17-зависимым воспалением, а не отсутствием нейтрофильного надзора за пародонтальной инфекцией [53, 85]. Таким образом, на примере патогенеза пародонтита при LAD-1 показано, что развитие заболеваний пародонта при ряде врожденных нарушений количества и функций нейтрофильных гранулоцитов может быть связано не столько с дефектом их защитно-эффекторной активности, сколько с нарушением иммунорегуляторной функции тканевых нейтрофилов [53, 83, 85]. Кроме того, разрушение тканей в очаге воспаления при LAD-1-пародонтите является следствием отсутствия нейтрофилов в отличие от многих хронических воспалительных заболеваний, включая и классический хронический пародонтит, ассоциированных с чрезмерным накоплением и гиперактивацией нейтрофильных гранулоцитов [53].

Важные результаты о функциональных возможностях нейтрофилов ротовой полости, полученные группой датских и шведских ученых, были опубликованы в 2015 г. [82]. Установлено, что многочисленные нейтрофилы слюны, собранной у здоровых доноров рано утром до чистки зубов, высвобождают внеклеточные ловушки (NETs) *in vivo*, то есть подвергаются нетозу. Индуктором этого процесса является содержащий сиаловую кислоту тетрасахарид сиалил Lewis^x муцинов слюны, который выступает в качестве лиганда мембранных L-селектинов нейтрофилов. Образование NETs при этом происходит NADPH-оксидаза-независимым путем, отличным от нетоза, индуцированного бактериями или форбол-миристан-ацетатом (PMA). Индуцированные слюной NETs демонстрируют повышенную устойчивость к ДНКазе, а также более выраженную способность захватывать и убивать бактерии вследствие повышенного содержания в них антимикробных белков кальгранулина и кателицидина LL37 (hCAP-18) по срав-

нению с NETs, образующимися при воздействии бактерий или РМА [82]. Из всех полученных данных авторами были сделаны два важных вывода. Во-первых, различные механизмы нетоза приводят к образованию функционально различных NETs. Во-вторых, переход в состояние внеклеточных ловушек с антимикробной активностью является нормальной судьбой оральных нейтрофилов и играет важную роль в поддержании здоровья ротовой полости [82].

Таким образом, результаты исследований последних лет значительно расширяют наши представления о роли нейтрофильных гранулоцитов как на организменном, так и на тканевом уровне. С одной стороны, в условиях здоровья, в отсутствие воспалительных стимулов, организм постоянно «держит в тонусе» циркулирующие в крови нейтрофилы, поставляя праймирующие сигналы от комменсальной микробиоты, на случай «военных действий», когда им потребуется мигрировать в ткани и реализовать свои «традиционные» функции в качестве «защитников первой линии обороны». При этом легочное сосудистое пространство, наряду с печенью и селезенкой, представляется основным «местом дислокации» нейтрофилов, готовых

при необходимости выйти в периферическое кровообращение и отреагировать на повреждение или инфекции, что было отмечено в первой части нашего обзора [5].

С другой стороны, нейтрофилы инфильтрируют многие органы и ткани даже в условиях здоровья, что свидетельствует об их гистофизиологическом потенциале. В поддержании структурнофункциональной стабильности разных органов и систем играют роль как потенциально деструктивные нейтрофильные факторы, например необходимые для физиологической деградации компонентов внеклеточного матрикса эндометрия во время фазы десквамации, так и способность нейтрофилов поддерживать репарацию, например за счет влияния на экспрессию ряда генов и пролиферацию эпителиоцитов кишечника, кератиноцитов и фибробластов кожи или на физиологический ангиогенез женского репродуктивного тракта. Стабилизирующее и регулирующее влияние нейтрофилов по отношению к комменсальной био пленкообразующей микробиоте, например в ротовой полости, свидетельствует об их важности в формировании колонизационной резистентности и поддержании мукозального гомеостаза.

Список литературы/References

1. Алиева М.С., Расулов И.М., Магомедов М.А., Мейланова Р.Д. Современные аспекты этиологии и патогенеза пародонтита // Известия Дагестанского государственного университета. Естественные и точные науки. 2013. № 1 (22). С. 25–29. [Aliyeva M.S., Rasulov I.M., Magomedov M.A., Meylanova R.D. Modern aspects of the etiology and pathogenesis of periodontitis. *Izvestiya Dagestanskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye i tochnye nauki = Proceedings of Dagestan State Pedagogical University. Natural and Exact Sciences*, 2013, no. 1 (22), pp. 25–29. (In Russ.)]
2. Вольф Г.Ф., Хэссел Т.М. Пародонтология. Гигиенические аспекты. Пер. с англ.; под ред. Г.И. Ронь. М.: Медпресс-информ, 2014. 360 с. [Wolf H.F., Hassell T.M. Color atlas of dental hygiene: periodontology. Ed. G.I. Ron'. *Moscow: Medpress-inform*. 2014. 360 p. (In Russ.)]
3. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН, 2009. 208 с. [Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophil extracellular traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. *Moscow: Publishing house RAMS*, 2009. 208 p. (In Russ.)]
4. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: УрО РАН, 2001. 288 с. [Dolgushin I.I., Bukharin O.V. Neutrophils and homeostasis. *Ekaterinburg: The Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2001. 288 p. (In Russ.)]
5. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные гранулоциты: участие в гомеостатических и репаративных процессах. Часть I // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 609–624. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil granulocytes: participation in homeostatic and reparative processes. Part I. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 609–624. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-NGP-1257
6. Лебедева О.П., Рудых Н.А., Полякова И.С., Пахомов С.П., Чурносков М.И., Самборская Н.И. Антимикробные пептиды первая линия антиинфекционной защиты женских половых путей // Научные ведомости Белгородского Государственного Университета. Серия: Медицина. Фармация. 2010. № 22 (93), вып. 12. С. 25–30. [Lebedeva O.P., Rudyh N.A., Polyakova I.S., Pakhomov S.P., Churnosov M.I., Samborskaya N.I. Antimicrobial peptides — the first line of anti-infectious defence in female reproductive tract. *Nauchnye ведомosti Belgorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya = Scientific bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine, Pharmacy*, 2010, no. 22 (93), pp. 25–30. (In Russ.)]
7. Степанова Т.Ю., Тимофеева А.В. Микробиом ротовой полости человека // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 5. [Stepanova T.Y., Timofeeva A.V. Oral human microbiome. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2016, no. 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25212> (In Russ.)]
8. Хабибуллина А.Р., Тимофеева А.В. Микробиом дентальной бляшки человека // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 3. [Khabibullina A.R., Timofeeva A.V. Human dental plaque microbiome. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 3. (In Russ.)] URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26539>
9. Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 11, pp. 5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005

10. Akiyama I., Yoshino O., Osuga Y., Shi J., Takamura M., Harada M., Koga K., Hirota Y., Hirata T., Fujii T., Saito S., Kozuma S. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. *Reprod. Sci.*, 2014, vol. 21, iss. 6, pp. 772–777. doi: 10.1177/1933719113518988
11. Amin M., Ho A.C., Lin J.Y., Batista da Silva A.P., Glogauer M., Ellen R.P. Induction of de novo subcortical actin filament assembly by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 6, pp. 3650–3654. doi: 10.1128/IAI.72.6.3650-3654.2004
12. Amsalem H., Kwan M., Hazan A., Zhang J., Jones R.L., Whittle W., Kingdom J.C., Croy B.A., Lye S.J., Dunk C.E. Identification of a novel neutrophil population: proangiogenic granulocytes in second-trimester human decidua. *J. Immunol.*, 2014, vol. 193, iss. 6, pp. 3070–3079. doi: 10.4049/jimmunol.1303117
13. Arck P.C., Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat. Med.*, 2013, vol. 19, iss. 5, pp. 548–556. doi: 10.1038/nm.3160
14. Armstrong G.M., Maybin J.A., Murray A.A., Nicol M., Walker C., Saunders P.T.K., Rossi A.G., Critchley H.O.D. Endometrial apoptosis and neutrophil infiltration during menstruation exhibits spatial and temporal dynamics that are recapitulated in a mouse model. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 17416. doi: 10.1038/s41598-017-17565-x
15. Berezow A.B., Darveau R.P. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*, 2011, vol. 55, iss. 1, pp. 36–47. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x
16. Bollapragada S., Youssef R., Jordan F., Greer I., Norman J., Nelson S. Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2009, vol. 200, iss. 1, pp. 104.e1–104.e11. doi: 10.1016/j.ajog.2008.08.032
17. Brannstrom M., Enskog A. Leukocyte networks and ovulation. *J. Reprod. Immunol.*, 2002, vol. 57, iss. 1–2, pp. 47–60. doi: 10.1016/S0165-0378(02)00009-8
18. Brissette C.A., Pham T.T., Coats S.R., Darveau R.P., Lukehart S.A. *Treponema denticola* does not induce production of common innate immune mediators from primary gingival epithelial cells. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2008, vol. 23, iss. 6, pp. 474–481. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00452.x
19. Brown L.F., Detmar M., Claffey K., Nagy J.A., Feng D., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*, 1997, vol. 79, pp. 233–269. doi: 10.1007/978-3-0348-9006-9_10
20. Bukulmez O., Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Hum. Reprod. Update*, 2000, vol. 6, iss. 1, 15 p. doi: 10.1093/humupd/6.1.1
21. Campbell E.L., Bruyninckx W.J., Kelly C.J., Glover L.E., McNamee E.N., Bowers B.E., Bayless A.J., Scully M., Saeedi B.J., Golden-Mason L., Ehrentraut S.F., Curtis V.F., Burgess A., Garvey J.F., Sorensen A., Nemenoff R., Jedlicka P., Taylor C.T., Kominsky D.J., Colgan S.P. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity*, 2014, vol. 40, iss. 1, pp. 66–77. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.020
22. Cortés-Vieyra R., Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. *J. Immunol. Res.*, 2016, vol. 2016, 9 p. doi: 10.1155/2016/1396106
23. Curtis M.A., Zenobia C., Darveau R.P. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell. Host Microbe*, 2011, vol. 10, iss. 4, pp. 302–306. doi: 10.1016/j.chom.2011.09.008
24. Dababneh R., Al-Wahadneh A.M., Hamadneh S., Khouri A., Bissada N.F. Periodontal manifestation of leukocyte adhesion deficiency type I. *J. Periodontol.*, 2008, vol. 79, iss. 4, pp. 764–768. doi: 10.1902/jop.2008.070323
25. Darveau R.P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, iss. 7, pp. 481–490. doi: 10.1038/nrmicro2337
26. Darveau R.P., Belton C.M., Reife R.A., Lamont R.J. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 4, pp. 1660–1665.
27. Dashper S.G., Seers C.A., Tan K.H., Reynolds E.C. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J. Dental Res.*, 2011, vol. 90, iss. 6, pp. 691–703. doi: 10.1177/0022034510385242
28. Deas D.E., Mackey S.A., McDonnell H.T. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology 2000*, 2003, vol. 32, iss. 1, pp. 82–104. doi: 10.1046/j.0906-6713.2003.03207.x
29. Delima A.J., Van Dyke T.E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 2003, vol. 31, iss. 1, pp. 55–76. doi: 10.1034/j.1600-0757.2003.03105.x
30. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 192, no. 19, pp. 5002–5017. doi: 10.1128/JB.00542-10
31. Dixon D.R., Bainbridge B.W., Darveau R.P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology 2000*, 2004, vol. 35, iss. 1, pp. 53–74. doi: 10.1111/j.0906-6713.2004.003556.x
32. Dunbar B., Patel M., Fahey J., Wira C. Endocrine control of mucosal immunity in the female reproductive tract: impact of environmental disruptors. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2012, vol. 354, iss. 1–2, pp. 85–93. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.002
33. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1995, vol. 146, no. 5, pp. 1029–1039.
34. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.*, 1997, vol. 18, iss. 1, pp. 4–25. doi: 10.1210/edrv.18.1.0287
35. Fine N., Hassanpour S., Borenstein A., Sima C., Oveisi M., Scholey J., Cherney D., Glogauer M. Distinct oral neutrophil subsets define health and periodontal disease states. *J. Dental Res.*, 2016, vol. 95, iss. 8, pp. 931–938. doi: 10.1177/0022034516645564
36. Fischbach M.A., Sonnenburg J.L. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe*, 2011, vol. 10, iss. 4, pp. 336–347. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.002
37. Flannigan K.L., Ngo V.L., Geem D., Harusato A., Hirota S.A., Parkos C.A., Lukacs N.W., Nusrat A., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., Gewirtz A.T., Denning T.L. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol.*, 2017, vol. 10, iss. 3, pp. 673–684. doi: 10.1038/mi.2016.80
38. Fournier B.M., Parkos C.A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.*, 2012, vol. 5, pp. 354–366. doi: 10.1038/mi.2012.24

39. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009, vol. 16, iss. 3, pp. 183–194. doi: 10.1016%2Fj.ccr.2009.06.017
40. Fujioka M., Sasa R., Inoue M., Nakamura M. Immunological characterization of junctional epithelium: an immunohistochemical study. *Dental Med. Res.*, 2009, vol. 29, iss. 3, pp. 253–258. doi: 10.7881/dentalmedres.29.253
41. Gargett C.E., Lederman F., Heryanto B., Gambino L.S., Rogers P.A. Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Hum. Reprod.*, 2001, vol. 16, iss. 6, pp. 1065–1075. doi: 10.1093/humrep/16.6.1065
42. Gasparoto T.H., Vieira N.A., Porto V.C., Campanelli A.P., Lara V.S. Differences between salivary and blood neutrophils from elderly and young denture wearers. *J. Oral. Rehabil.*, 2011, vol. 38, iss. 1, pp. 41–51. doi: 10.1111/j.1365-2842.2010.02126.x
43. Giaglis S., Stoikou M., Grimolizzi F., Subramanian B.Y., van Breda S.V., Hoesli I., Lapaire O., Hasler P., Than N.G., Hahn S. Neutrophil migration into the placenta: good, bad or deadly? *Cell Adh. Migr.*, 2016, vol. 10, iss. 1–2, pp. 208–225. doi: 10.1080/19336918.2016.1148866
44. Giaglis S., Stoikou M., Sur Chowdhury C., Schaefer G., Grimolizzi F., Rossi S.W., Hoesli I.M., Lapaire O., Hasler P., Hahn S. Multimodal regulation of NET formation in pregnancy: Progesterone antagonizes the Pro-NETotic effect of estrogen and G-CSF. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7: 565. doi: 10.3389/fimmu.2016.00565
45. Gomez-Lopez N., StLouis D., Lehr M.A., Sanchez-Rodriguez E.N., Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, vol. 11, iss. 6, pp. 571–581. doi: 10.1038/cmi.2014.46
46. Gonzalez J.M., Xu H., Chai J., Ofori E., Elovitz M.A. Preterm and term cervical ripening in CD1 mice (*Mus musculus*): similar or divergent molecular mechanisms? *Biol. Reprod.*, 2009, vol. 81, iss. 6, pp. 1226–1232. doi: 10.1095/biolreprod.108.075309
47. Greer A., Irie K., Hashim A., Leroux B.G., Chang A.M., Curtis M.A., Darveau R.P. Site-specific neutrophil migration and CXCL2 expression in periodontal tissue. *J. Dental Res.*, 2016, vol. 95, iss. 8, pp. 946–952. doi: 10.1177%2F0022034516641036
48. Groeger S., Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 208. doi: 10.3389/fimmu.2019.00208
49. Hahn S., Giaglis S., Hoesli I., Hasler P. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Front. Immunol.*, 2012, vol. 3: 362. doi: 10.3389/fimmu.2012.00362
50. Hahn S., Hasler P., Vokalova L., van Breda S.V., Lapaire O., Than G.N., Hoesli I., Rossi S.W. The role of neutrophil activation in determining the outcome of pregnancy and modulation by hormones and/or cytokines. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019. doi: 10.1111/cei.13278
51. Hajishengallis E., Hajishengallis G. Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults. *J. Dental Res.*, 2014, vol. 93, iss. 3, pp. 231–237. doi: 10.1177/0022034513507956
52. Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012, vol. 10, pp. 717–725. doi: 10.1038/nrmicro2873
53. Hajishengallis G., Chavakis T., Hajishengallis E., Lambris J.D. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, vol. 98, iss. 4, pp. 539–548. doi: 10.1189/jlb.3VMR1014-468R
54. Hall C.H.T., Campbell E.L., Colgan S.P. Neutrophils as components of mucosal homeostasis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, vol. 4, iss. 3, pp. 329–337. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.07.001
55. Horne A.W., Stock S.J., King A.E. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction*, 2008, vol. 135, iss. 6, pp. 739–749. doi: 10.1530/REP-07-0564
56. Ji S., Choi Y. Innate immune response to oral bacteria and the immune evasive characteristics of periodontal pathogens. *J. Periodontal. Implant. Sci.*, 2013, vol. 43, iss. 1, pp. 3–11. doi: 10.5051/jpis.2013.43.1.3
57. Jiemtaweeboon S., Shirasuna K., Nitta A., Kobayashi A., Schubert H., Shimizu T., Miyamoto A. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2011, vol. 9: 79. doi: 10.1186/1477-7827-9-79
58. Junqueira L.C., Zugaib M., Montes G.S., Toledo O.M., Krisztan R.M., Shigihara K.M. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1980, vol. 138, iss. 3, pp. 273–281. doi: 10.1016/0002-9378(80)90248-3
59. Kaitu'u T.J., Shen J., Zhang J., Morison N.B., Salamonsen L.A. Matrix metalloproteinases in endometrial breakdown and repair: functional significance in a mouse model. *Biol. Reprod.*, 2005, vol. 73, iss. 4, pp. 672–680. doi: 10.1095/biolreprod.105.042473
60. Kaitu'u-Lino T.J., Morison N.B., Salamonsen L.A. Neutrophil depletion retards endometrial repair in a mouse model. *Cell Tissue Res.*, 2007, vol. 328, iss. 1, pp. 197–206. doi: 10.1007/s00441-006-0358-2
61. Kelly C.J., Zheng L., Campbell E.L., Saeedi B., Scholz C.C., Bayless A.J., Wilson K.E., Glover L.E., Kominsky D.J., Magnuson A., Weir T.L., Ehrentauf S.F., Pickel C., Kuhn K.A., Lanis J.M., Nguyen V., Taylor C.T., Colgan S.P. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, iss. 5, pp. 662–671. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.005
62. Khajan M. Role of neutrophils in disease pathogenesis. *InTechOpen*, 2017. 178 p. doi: 10.5772/65581
63. Kinane D.F., Hart T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2003, vol. 14, iss. 6, pp. 430–449. doi: 10.1177%2F154411130301400605
64. King A.E., Critchley H.O., Sallenave J.M., Kelly R.W. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, vol. 88, iss. 9, pp. 4426–4431. doi: 10.1210/jc.2003-030239
65. Koch S., Capaldo C.T., Hilgarth R.S., Fournier B., Parkos C.A., Nusrat A. Protein kinase CK2 is a critical regulator of epithelial homeostasis in chronic intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.*, 2013, vol. 6, pp. 136–145. doi: 10.1038/mi.2012.57
66. Kropf P., Baud D., Marshall S.E., Munder M., Mosley A., Fuentes J.M., Bangham C.R., Taylor G.P., Herath S., Choi B.S., Soler G., Teoh T., Modolell M., Müller I. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, 2007, vol. 37, iss. 4, pp. 935–945. doi: 10.1002/eji.200636542
67. Landzberg M., Doering H., Aboodi G.M., Tenenbaum H.C., Glogauer M. Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease. *J. Periodontal. Res.*, 2015, vol. 50, iss. 3, pp. 330–336. doi: 10.1111/jre.12211

68. Lasarte S., Samaniego R., Salinas-Muñoz L., Guia-Gonzalez M.A., Weiss L.A., Mercader E., Ceballos-García E., Navarro-González T., Moreno-Ochoa L., Perez-Millan F., Pion M., Sanchez-Mateos P., Hidalgo A., Muñoz-Fernandez M.A., Relloso M. Sex hormones coordinate neutrophil immunity in the vagina by controlling chemokine gradients. *J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 213, iss. 3, pp. 476–484. doi: 10.1093/infdis/jiv402
69. Lathbury L.J., Salamonsen L.A. In vitro studies of the potential role of neutrophils in the process of menstruation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, vol. 6, iss. 10, pp. 899–906. doi: 10.1093/molehr/6.10.899
70. Lee S.K., Kim C.J., Kim D.J., Kang J.H. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network*, 2015, vol. 15, iss. 1, pp. 16–26. doi: 10.4110/in.2015.15.1.16
71. Leiding J.W. Neutrophil evolution and their diseases in humans. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 1009. doi: 10.3389/fimmu.2017.01009
72. Li S., Herrera G.G., Tam K.K., Lizarraga J.S., Beedle M.T., Winuthayanon W. Estrogen action in the epithelial cells of the mouse vagina regulates neutrophil infiltration and vaginal tissue integrity. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8: 11247. doi: 10.1038/s41598-018-29423-5
73. Louis N.A., Hamilton K.E., Kong T., Colgan S.P. HIF-dependent induction of apical CD55 coordinates epithelial clearance of neutrophils. *FASEB J.*, 2005, vol. 19, no. 8, pp. 950–959. doi: 10.1096/fj.04-3251com
74. Luissint A.C., Parkos C.A., Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte–epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterology*, 2016, vol. 151, iss. 4, pp. 616–632. doi: 10.1053/j.gastro.2016.07.008
75. Magalhães M.A., Sun C.X., Glogauer M., Ellen R.P. The major outer sheath protein of *Treponema denticola* selectively inhibits Rac1 activation in murine neutrophils. *Cell. Microbiol.*, 2008, vol. 10, iss. 2, pp. 344–354. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01045.x
76. Mager D.L., Ximenez-Fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. Clin. Periodontol.*, 2003, vol. 30, iss. 7, pp. 644–654. doi: 10.1034/j.1600-051X.2003.00376.x
77. Manresa M.C., Taylor C.T. Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, vol. 3, iss. 3, pp. 303–315. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.02.004
78. Marder W., Knight J.S., Kaplan M.J., Somers E.C., Zhang X., O'Dell A.A., Padmanabhan V., Lieberman R.W. Placental histology and neutrophil extracellular traps in lupus and pre-eclampsia pregnancies. *Lupus Sci. Med.*, 2016, vol. 3, iss. 1: e000134. doi: 10.1136/lupus-2015-000134
79. Matthews J.D., Weight C.M., Parkos C.A. Leukocyte-epithelial interactions and mucosal homeostasis. *Toxicol Pathol.*, 2014, vol. 42, iss. 1, pp. 91–98. doi: 10.1177/2F0192623313511336
80. Menning A., Walter A., Rudolph M., Gashaw I., Fritzsche K.H., Roese L. Granulocytes and vascularization regulate uterine bleeding and tissue remodeling in a mouse menstruation model. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 8: e41800. doi: 10.1371/journal.pone.0041800
81. Mittal P., Romero R., Tarca A.L., Gonzalez J., Draghici S., Xu Y., Dong Z., Nhan-Chang C.L., Chaiworapongsa T., Lye S., Kusanovic J.P., Lipovich L., Mazaki-Tovi S., Hassan S.S., Mesiano S., Kim C.J. Characterization of the myometrial transcriptome and biological pathways of spontaneous human labor at term. *J. Perinat. Med.*, 2010, vol. 38, iss. 6, pp. 617–643. doi: 10.1515/jpm.2010.097
82. Mohanty T., Sjögren J., Kahn F., Abu-Humaidan A.H., Fisker N., Assing K., Mörgelin M., Bengtsson A.A., Borregaard N., Sørensen O.E. A novel mechanism for NETosis provides antimicrobial defense at the oral mucosa. *Blood*, 2015, vol. 126, iss. 18, pp. 2128–2137. doi: 10.1182/blood-2015-04-641142
83. Moutsopoulos N.M., Konkel J.E. Tissue-specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends Immunol.*, 2018, vol. 39, iss. 4, pp. 276–287. doi: 10.1016/j.it.2017.08.005
84. Moutsopoulos N.M., Lionakis M.S., Hajishengallis G. Inborn errors in immunity: unique natural models to dissect oral immunity. *J. Dental Res.*, 2015, vol. 94, iss. 6, pp. 753–758. doi: 10.1177/2F0022034515583533
85. Moutsopoulos N.M., Konkel J., Sarmadi M., Eskin M.A., Wild T., Dutzan N., Abusleme L., Zenobia C., Hosur K.B., Abe T., Uzel G., Chen W., Chavakis T., Holland S.M., Hajishengallis G. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency Type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Sci. Transl. Med.*, 2014, vol. 6, iss. 229, pp. 229ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3007696
86. Nakamura M. Histological and immunological characteristics of the junctional epithelium. *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, 2018, vol. 54, iss. 2, pp. 59–65. doi: 10.1016/j.jdsr.2017.11.004
87. Nicolás-Ávila J.Á., Adrover J.M., Hidalgo A. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity*, 2017, vol. 46, iss. 1, pp. 15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.012
88. Nicu E.A., Rijkschroeff P., Wartewig E., Nazmi K., Loos B.G. Characterization of oral polymorphonuclear neutrophils in periodontitis patients: a case-control study. *BMC Oral Health*, 2018, vol. 18: 149. doi: 10.1186/s12903-018-0615-2
89. Nussbaum G., Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J. Clin. Periodontol.*, 2011, vol. 38, iss. s11, Special Issue: Proceedings of the 7th European Workshop on Periodontology, pp. 49–59. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01678.x
90. Ochiel D.O., Fahey J.V., Ghosh M., Haddad S.N., Wira C.R. Innate immunity in the female reproductive tract: role of sex hormones in regulating uterine epithelial cell protection against pathogens. *Curr. Womens Health Rev.*, 2008, vol. 4, iss. 2, pp. 102–117. doi: 10.2174/157340408784246395
91. Olsen I., Hajishengallis G. Major neutrophil functions subverted by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral. Microbiol.*, 2016, vol. 8: 30936. doi: 10.3402/jom.v8.30936
92. Osmers R., Rath W., Adelman-Grill B.C., Fittkow C., Kuloczik M., Szeverenyi M., Tschesche H., Kuhn W. Origin of cervical collagenase during parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992, vol. 166, iss. 5, pp. 1455–1460. doi: 10.1016/0002-9378(92)91619-L
93. Parkos C.A. Neutrophil-epithelial interactions: a double-edged sword. *Am. J. Pathol.*, 2016, vol. 186, iss. 6, pp. 1404–1416. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.02.001
94. Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology*, 2006, vol. 42, iss. 1, pp. 80–87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x
95. Puthengady Thomas B., Sun C.X., Bajenova E., Ellen R.P., Glogauer M. Modulation of human neutrophil functions in vitro by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 3, pp. 1954–1957. doi: 10.1128/IAI.74.3.1954-1957.2006

96. Reis Machado J., da Silva M.V., Cavellani C.L., dos Reis M.A., Monteiro M.L., Teixeira Vde P., Miranda Corrêa R.R. Mucosal immunity in the female genital tract, HIV/AIDS. *BioMed Res. Int.*, 2014, vol. 2014, 20 p. doi: 10.1155/2014/350195
97. Rijkschroeff P., Loos B.G., Nicu E.A. Impaired polymorphonuclear neutrophils in the oral cavity of edentulous individuals. *Eur. J. Oral Sci.*, 2017, vol. 125, iss. 5, pp. 371–378. doi: 10.1111/eos.12367
98. Rijkschroeff P., Loos B.G., Nicu E.A. Oral polymorphonuclear neutrophil contributes to oral health. *Curr. Oral Health Rep.*, 2018, vol. 5, pp. 211–220. doi: 10.1007/s40496-018-0199-6
99. Rijkschroeff P., Jansen I.D., van der Weijden F.A., Keijser B.J., Loos B.G., Nicu E.A. Oral polymorphonuclear neutrophil characteristics in relation to oral health: a cross-sectional, observational clinical study. *Int. J. Oral Sci.*, 2016, vol. 8, iss. 3, pp. 191–198. doi: 10.1038/ijos.2016.23
100. Ryder M.I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology 2000*, 2010, vol. 53, iss. 1, pp. 124–137. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00327.x
101. Sakamoto Y., Moran P., Bulmer J.N., Searle R.F., Robson S.C. Macrophages and not granulocytes are involved in cervical ripening. *J. Reprod. Immunol.*, 2005, vol. 66, iss. 2, pp. 161–173. doi: 10.1016/j.jri.2005.04.005
102. Sakamoto Y., Moran P., Searle R.F., Bulmer J.N., Robson S.C. Interleukin-8 is involved in cervical dilatation but not in prelabour cervical ripening. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 138, iss. 1, pp. 151–157. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02584.x
103. Salamonsen L.A., Woolley D.E. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J. Reprod. Immunol.*, 1999, vol. 44, iss. 1–2, 27 p. doi: 10.1016/S0165-0378(99)00002-9
104. Salinas-Muñoz L., Campos-Fernández R., Mercader E., Olivera-Valle I., Fernández-Pacheco C., Matilla L., García-Bordas J., Brazil J.C., Parkos C.A., Asensio F., Muñoz-Fernández M.A., Hidalgo A., Sánchez-Mateos P., Samaniego R., Relloso M. Estrogen receptor-alpha (ESR1) governs the lower female reproductive tract vulnerability to *Candida albicans*. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 1033. doi: 10.3389/fimmu.2018.01033
105. Schmidt S., Moser M., Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol. Immunol.*, 2012, vol. 55, iss. 1, pp. 49–58. doi: 10.1016/j.molimm.2012.11.006
106. Sela M.N. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2001, vol. 12, iss. 5, pp. 399–413. doi: 10.1177/10454411010120050301
107. Shaul M.E., Fridlender Z.G. Cancer related circulating and tumor-associated neutrophils — subtypes, sources and function. *FEBS J.*, 2018, vol. 285, iss. 23, pp. 4316–4342. doi: 10.1111/febs.14524
108. Shirasuna K., Jiemtaweeboon S., Raddatz S., Nitta A., Schuberth H.J., Bollwein H., Shimizu T., Miyamoto A. Rapid accumulation of polymorphonuclear neutrophils in the Corpus luteum during prostaglandin F(2a)-induced luteolysis in the cow. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 1: e29054. doi: 10.1371/journal.pone.0029054
109. Shynlova O., Nedd-Roderique T., Li Y., Dorogin A., Nguyen T., Lye S.J. Infiltration of myeloid cells into decidua is a critical early event in the labour cascade and post-partum uterine remodelling. *J. Cell. Mol. Med.*, 2013, vol. 17, iss. 2, pp. 311–324. doi: 10.1111/jcmm.12012
110. Singh N., Herbert B., Sooranna G.R., Orsi N.M., Edey L., Dasgupta T., Sooranna S.R., Yellon S.M., Johnson M.R. Is myometrial inflammation a cause or a consequence of term human labour? *J. Endocrinol.*, 2017, vol. 235, iss. 1, pp. 69–83. doi: 10.1530/JOE-17-0318
111. Ssemaganda A., Kindinger L., Bergin P., Nielsen L., Mpendo J., Ssetaala A., Kiwanuka N., Munder M., Teoh T.G., Kropf P., Müller I. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 2: e85696. doi: 10.1371/journal.pone.0085696
112. Stanley R.L., Ohashi T., Gordon J., Mowa C.N. A proteomic profile of postpartum cervical repair in mice. *J. Mol. Endocrinol.*, 2018, vol. 60, iss. 1, pp. 17–28. doi: 10.1530/JME-17-0179
113. Stark M.A., Huo Y., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S., Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 2005, vol. 22, iss. 3, pp. 285–294. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.011
114. Stocco C., Telleria C., Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.*, 2007, vol. 28, iss. 1, pp. 117–149. doi: 10.1210/er.2006-0022
115. Sugino N., Okuda K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *J. Reprod. Dev.*, 2007, vol. 53, iss. 5, pp. 977–986. doi: 10.1262/jrd.19047
116. Sumagin R., Brazil J.C., Nava P., Nishio H., Alam A., Luissint A.C., Weber D.A., Neish A.S., Nusrat A., Parkos C.A. Neutrophil interactions with epithelial expressed ICAM-1 enhances intestinal mucosal wound healing. *Mucosal Immunol.*, 2016, vol. 9, iss. 5, pp. 1151–1162. doi: 10.1038/mi.2015.135
117. Sumagin R., Parkos C.A. Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration. *Tissue Barriers*, 2015, vol. 3, iss. 1–2: e969100. doi: 10.4161/21688362.2014.969100
118. Sumagin R., Robin A.Z., Nusrat A., Parkos C.A. Transmigrated neutrophils in the intestinal lumen engage ICAM 1 to regulate the epithelial barrier and neutrophil recruitment. *Mucosal Immunol.*, 2014, vol. 7, iss. 4, pp. 905–915. doi: 10.1038/mi.2013.106
119. Talbott H., Delaney A., Zhang P., Yu Y., Cushman R.A., Cupp A.S., Hou X., Davis J.D. Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion. *Reproduction*, 2014, vol. 148, iss. 1, pp. 21–31. doi: 10.1530/REP-13-0602
120. Tawara F., Tamura N., Suganuma N., Kanayama N. Changes in cervical neutrophil elastase levels during the menstrual cycle. *Reprod. Med. Biol.*, 2012, vol. 11, iss. 1, pp. 65–68. doi: 10.1007/s12522-011-0104-7
121. Thomson A.J., Telfer J.F., Young A., Campbell S., Stewart C.J., Cameron I.T., Greer I.A., Norman J.E. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Human Reprod.*, 1999, vol. 14, iss. 1, pp. 229–236. doi: 10.1093/humrep/15.1.229
122. Timmons B., Akins M., Mahendroo M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2010, vol. 21, iss. 6, pp. 353–361. doi: 10.1016/j.tem.2010.01.011
123. Timmons B.C., Fairhurst A.M., Mahendroo M.S. Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, iss. 5, pp. 2700–2707. doi: 10.4049/jimmunol.0803138
124. Timmons B.C., Mahendroo M.S. Timing of neutrophil activation and expression of proinflammatory markers do not support a role for neutrophils in cervical ripening in the mouse. *Biol. Reprod.*, 2006, vol. 74, iss. 2, pp. 236–245. doi: 10.1095/biolreprod.105.044891

125. Tinsley J.H., Wu M.H., Ma W.Y., Taulman A.C., Yuan S.Y. Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 35, pp. 24930–24934. doi: 10.1074/jbc.274.35.24930
126. Tsukamoto Y., Usui M., Yamamoto G., Takagi Y., Tachikawa T., Yamamoto M., Nakamura M. Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *J. Periodontal. Res.*, 2012, vol. 47, iss. 6, pp. 750–757. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01490.x
127. Uriarte S.M., Edmisson J.S., Jimenez-Flores E. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunol. Rev.*, 2016, vol. 273, iss. 1, special iss.: *Neutrophils*, pp. 282–298. doi: 10.1111/imr.12451
128. Vincent A.J., Malakooti N., Zhang J., Rogers P.A.W., Affandi B., Salamonsen L.A. Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum. Reprod.*, 1999, vol. 14, iss. 3, pp. 807–815. doi: 10.1093/humrep/14.3.807
129. Wade W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res.*, 2013, vol. 69, iss. 1, pp. 137–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.006
130. Webb C.R., Koboziev I., Furr K.L., Grisham M.B. Protective and pro-inflammatory roles of intestinal bacteria. *Pathophysiology*, 2016, vol. 23, iss. 2, pp. 67–80. doi: 10.1016/j.pathophys.2016.02.002
131. Winkler M., Fischer D.C., Ruck P., Marx T., Kaiserling E., Oberpichler A., Tschesche H., Rath W. Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum. Reprod.*, 1999, vol. 14, iss. 4, pp. 1096–1000. doi: 10.1093/humrep/14.4.1096
132. Winter S.E., Winter M.G., Xavier M.N., Thiennimitr P., Poon V., Keestra A.M., Laughlin R.C., Gomez G., Wu J., Lawhon S.D., Popova I.E., Parikh S.J., Adams L.G., Tsolis R.M., Stewart V.J., Bäuml A.J. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science*, 2013, vol. 339, iss. 6120, pp. 708–711. doi: 10.1126/science.1232467
133. Wira C.R., Fahey J.V., Sentman C.L., Pioli P.A., Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.*, 2005, vol. 206, iss. 1, pp. 306–335. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x
134. Wira C.R., Rodriguez-Garcia M., Patel M.V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, vol. 15, iss. 4, pp. 217–230. doi: 10.1038/nri3819
135. Yamazaki T., Miyamoto M., Yamada S., Okuda K., Ishihara K. Surface protease of *Treponema denticola* hydrolyzes C3 and influences function of polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect.*, 2006, vol. 8, iss. 7, pp. 1758–1763. doi: 10.1016/j.micinf.2006.02.013
136. Yeaman G.R., Collins J.E., Currie J.K., Guyre P.M., Wira C.R., Fanger M.W. IFN- γ is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.*, vol. 160, iss. 10, pp. 5145–5153.
137. Yellon S.M. Contributions to the dynamics of cervix remodeling prior to term and preterm birth. *Biol. Reprod.*, 2017, vol. 96, iss. 1, pp. 13–23. doi: 10.1095/biolreprod.116.142844
138. Yoon M.Y., Yoon S.S. Disruption of the gut ecosystem by antibiotics. *Yonsei Med. J.*, 2018, vol. 59, iss. 1, pp. 4–12. doi: 10.3349/ymj.2018.59.1.4
139. Zaura E., Keijsers B.J.F., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.*, 2009, vol. 9: 259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259
140. Zenobia C., Luo X.L., Hashim A., Abe T., Jin L., Chang Y., Jin Z.C., Sun J.X., Hajishengallis G., Curtis M.A., Darveau R.P. Commensal bacteria-dependent select expression of CXCL2 contributes to periodontal tissue homeostasis. *Cell. Microbiol.*, 2013, vol. 15, iss. 8, pp. 1419–1426. doi: 10.1111/cmi.12127
141. Zhao H., Kalish F., Wong R.J., Stevenson D.K. Infiltration of myeloid cells in the pregnant uterus is affected by heme oxygenase-1. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, vol. 101, iss. 1, pp. 217–226. doi: 10.1189/jlb.1A0116-020RR
142. Zindl C.L., Lai J.F., Lee Y.K., Maynard C.L., Harbour S.N., Ouyang W., Chaplin D.D., Weaver C.T. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, iss. 31, pp. 12768–12773. doi: 10.1073/pnas.1300318110

Авторы:

Долгушин И.И., д.м.н., профессор, Президент ФГБОУ Южно-Уральский государственный медицинский университет (ФГБОУ ВО ЮГМУ) Минздрава России, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, г. Челябинск, Россия;

Мезентцева Е.А., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮГМУ Минздрава России, г. Челябинск, Россия.

Authors:

Dolgushin I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, President of South-Ural State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation;

Mezentseva E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.07.2019
Отправлена на доработку 26.11.2019
Принята к печати 11.03.2020

Received 26.07.2019
Revision received 26.11.2019
Accepted 11.03.2020

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ФИЛОГЕНЕТИКИ В ВИРУСОЛОГИИ

Ю.А. Вакуленко^{1,2}, А.Н. Лукашев^{1,3}, А.А. Девяткин³

¹Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме. Молекулярная филогенетика, и в частности статистическая филогенетика, широко применяется для решения фундаментальных и прикладных задач вирусологии. Байесовские, или статистические, филогенетические методы, вошедшие в практику 10–15 лет назад, значительно расширили круг вопросов, на которые можно получить ответы, исходя из анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Возможность использования разных моделей эволюции позволяет восстанавливать хронологию, географию и динамику распространения инфекции. Например, при анализе последовательностей ВИЧ глобально распространенной группы М байесовскими методами филогеографического анализа было показано, что последний общий предок этих вирусов с вероятностью 99% возник в окрестностях города Киншаса (Демократическая Республика Конго) в начале 1920-х гг. В другой работе показали, что серотип вируса гриппа H9N2, скорее всего, перешел к человеку от диких уток в Гонконге в конце 60-х гг. XX в. Кроме того, при помощи байесовского анализа можно оценить влияние определенных событий или принимаемых мер на развитие эпидемического процесса. Так, например, ретроспективно было показано, что число заражений вирусом гепатита С в Египте увеличилось на несколько порядков в середине XX в. Резкий рост новых случаев связывают с началом лечения шистосомоза. Лекарство вводили при помощи уколов, нестерильные шприцы применяли многократно. Набор методов байесовского анализа был использован в десятках тысяч исследований, описывающих разные аспекты возникновения и распространения инфекционных заболеваний человека и животных. Сложность байесовских филогенетических методов определяет строгие требования к анализируемым данным. Корректность результатов филогенетического анализа зависит от ряда факторов. Например, необходим выбор эволюционной модели, наиболее адекватно описывающей исследуемые объекты. Обязательным этапом при формулировании результатов является обоснование выбранной модели. Для вирусов характерно заимствование генетических элементов из других организмов, поэтому геномы даже близкородственных вирусов могут иметь негомологичные участки, непригодные для филогенетического анализа. Другим условием является создание репрезентативной выборки исследуемых объектов. Зачастую в публикациях не указываются все этапы выполнения анализа, из-за чего полученные результаты могут трактоваться неоднозначно. Коррект-

Адрес для переписки:

Девяткин Андрей Андреевич
119048, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8/2,
Институт молекулярной медицины, Первый Московский
государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова.
Тел.: 8 (495) 609-14-00.
E-mail: andreideviatkin@gmail.com

Contacts:

Andrei A. Deviatkin
119048, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8/2,
Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow
State Medical University.
Phone: +7 (495) 609-14-00.
E-mail: andreideviatkin@gmail.com

Для цитирования:

Вакуленко Ю.А., Лукашев А.Н., Девяткин А.А. Использование методов статистической филогенетики в вирусологии // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 42–56. doi: 10.15789/2220-7619-TUO-1519

Citation:

Vakulenko Yu.A., Lukashev A.N., Deviatkin A.A. The use of statistical phylogenetics in virology // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 42–56. doi: 10.15789/2220-7619-TUO-1519

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-115-50403.

ное использование методов статистической филогенетики в вирусологии возможно только при понимании принципов их работы, способов подготовки данных для анализа, критериев выбора эволюционных моделей для исследования.

Ключевые слова: молекулярная эпидемиология, байесовская филогенетика, вирусные популяции, расследование вспышек инфекционных заболеваний, рекомбинация, модели эволюции.

THE USE OF STATISTICAL PHYLOGENETICS IN VIROLOGY

Vakulenko Yu.A.^{a,b}, Lukashov A.N.^{b,c}, Deviatkin A.A.^c

^aMartsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^cInstitute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Molecular phylogenetics, particularly statistical phylogenetics, is widely used to solve the fundamental and applied problems in virology. Bayesian, or statistical, phylogenetic methods, which came into practice 10–15 years ago, markedly expanded the range of questions that can be answered based on analyzing nucleotide and amino acid sequences. An opportunity of using various evolution models allows inferring the chronology, geography and dynamics of the infection spreading. For example, analysis of globally distributed HIV group M by Bayesian methods demonstrated with a probability of 99% that the most recent common ancestor of these viruses existed in the surroundings of the city of Kinshasa (Democratic Republic of the Congo) in the early 1920s. Another study showed that H9N2 influenza virus most likely passed on to humans from wild ducks in Hong Kong in the late 1960s. In addition, using of the Bayesian analysis allows to evaluating the effect of measures taken on the development of the epidemic process. For example, it was shown retrospectively that the rate of hepatitis C virus infection cases in Egypt increased by several orders of magnitude in the mid-20th century. A sharp rise in new case rate is associated with the treatment for schistosomiasis by using non-sterile repeatedly used syringes. A set of Bayesian analysis methods has been applied in tens of thousands of researches describing various aspects of the occurrence and spread of infectious diseases in humans and animals. This was facilitated by the development and accessibility of software that implements these methods. The complexity of Bayesian phylogenetic methods imposes strict requirements on the data being analyzed. The correctness of the phylogenetic analysis data depends on various factors. For example, it is necessary to choose an evolutionary model that most adequately describes the studied objects. A mandatory step in formulating the results is the justification of the selected model. For viruses, the acquisition of genetic elements from other organisms is typical, therefore, the genomes even from closely related viruses may have non-homologous regions unsuitable for phylogenetic analysis. Another aspect is the creation of a representative dataset. Sometimes, all stages of the analysis are not indicated in publications, so that the data obtained can be interpreted ambiguously. The correct use of statistical phylogenetics methods in virology is possible only upon understanding their principles, proper methods of data preparation and evolutionary model selection criteria.

Key words: molecular epidemiology, Bayesian phylogenetics, viral populations, investigation of infectious diseases, recombination, evolutionary models.

Введение

Термин «филогения» был введен Эрнстом Геккелем в 1866 году в труде «Общая морфология организмов» [16]. Это слово состоит из двух корней. В оригинальной интерпретации первый корень, *phylon* (греч.), имеет три разных значения — «стебель», «ветвящаяся группа» и «линейная группа организмов». Второй корень, *genea* (греч.), трактовался как «история эволюции». Новый термин «филогения» служил заменой словосочетанию «эволюционная история групп организмов». Филогенетика — это изучение филогении, то есть изучение эволюционных взаимоотношений как на межвидовом, так и на внутривидовом уровнях. Филогенетический анализ является методом оценки эволюционных отношений организмов [14]. Филогенетическое дерево — это самый

распространенный способ иллюстрации результатов филогенетического анализа [16]. Оно представляет собой ветвящуюся диаграмму и состоит из нескольких частей. Корнем является место предполагаемого общего предка всех исследуемых организмов в дереве. Если взаимоотношения устанавливаются без учета предковой формы, то такое дерево называется неукорененным. Место исследуемого организма в дереве называется листом. От каждого листа отходит ветвь. Места соединения ветвей называются узлами.

В настоящее время филогенетические методы анализа широко применяются для решения фундаментальных и прикладных задач биологии. В текущем обзоре рассматриваются возможные применения методов статистической филогенетики в вирусологии. Молекулярная филогенетика, и в частности статистическая

филогенетика вирусов, получили наиболее широкое распространение. Это связано с тем, что большая часть вирусов, вызывающих инфекционные заболевания человека, обладают РНК-содержащим геномом [49]. Механизмы репликации РНК-вирусов характеризуются высокой частотой ошибок репликации, являющихся одним из факторов высокой молекулярной изменчивости вирусов. Для РНК-вирусов было предложено эмпирическое правило, гласящее, что полимеразы делают одну ошибку в каждом вновь синтезированном геноме [20]. Другим фактором высокой молекулярной изменчивости является быстрый цикл размножения и, соответственно, высокая частота «бутылочных горлышек», через которые проходит популяция вируса. Для многих вирусов цикл инфекции составляет порядка недели, а каждому следующему инфицированному организму передается ничтожно малая часть популяции вируса. Это ведет к высокой эффективности фиксации мутаций — пожалуй, даже более важной составляющей изменчивости вирусов, чем собственно возникновение мутаций при ошибках репликации генома. В результате, например, геном ВИЧ-1 изменяется за один год в среднем на 0,1–1% [8], вируса полиомиелита — на 1% [41], а коронавирусов — на 0,01–0,5% [78]. Это обуславливает высокую изменчивость, и, как следствие, необычайную адаптивную способность вирусных популяций к факторам среды.

С помощью сравнения нуклеотидных последовательностей можно определить родство между разными группами вирусов как на межвидовом, так и внутривидовом уровне. Исторически первые методы филогенетического анализа основывались на оценке генетических дистанций между последовательностями. Эти методы позволяют выявить родство вирусных последовательностей, грубо оценить скорость накопления замен и время происхождения общего предка. Оценка скорости накопления замен таким способом была бы возможна лишь в том случае, если бы эта скорость была постоянной, чего практически не бывает в вирусных популяциях. Байесовские (статистические) филогенетические методы, вошедшие в практику 10–15 лет назад, значительно расширили круг вопросов, на которые можно получить ответы, исходя из анализа нуклеотидных последовательностей. В рамках данных методов, в дополнение к моделям с заменой нуклеотидов, возможно использование концепции молекулярных часов и динамики численности популяций. Байесовский подход позволяет выбрать статистически наиболее достоверное филогенетическое дерево из всех возможных вариантов на основании расчета вероятности существования такого дерева при условии того, что имеется

дополнительная информация о свойствах исследуемой вирусной популяции.

Одним из преимуществ байесовских филогенетических методов является возможность использования не только нуклеотидных последовательностей вирусов, но и другой доступной информации, например данных о географическом происхождении и времени выделения вируса. Это позволяет датировать как события в эволюции вируса, произошедшие в далеком прошлом, так и восстанавливать ход эпидемии во времени при расследовании вспышек вирусных инфекций. Так, для эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке (декабрь 2013 — декабрь 2015) с помощью байесовских филогенетических методов удалось выяснить происхождение и динамику передачи вируса [35]. Благодаря использованию байесовских филогенетических методов было установлено, что самая распространенная группа ВИЧ-1 возникла в 1920-м году в городе Киншаса (ДРК) [30], а группой других исследователей описано появление первого инфицированного ВИЧ человека в США: нулевой пациент был заражен примерно в 1970-м году, с вероятностью 99% жил в городе Нью-Йорке [88]. Кроме того, байесовские филогенетические методы используются для обнаружения «подозрительных» событий. Так, например, было выяснено, что циркуляция не встречавшегося с 80-х годов генотипа А энтеровируса 71 в Китае в 2008–2010 гг. оказалась связанной с попаданием лабораторного штамма в окружающую среду [83]. Оценки времени происхождения вируса, полученные с помощью байесовских филогенетических методов, хорошо согласуются с данными эпидемиологической статистики, как было показано на примере вируса бешенства [18].

Возможность использования разных моделей эволюции позволяет восстанавливать хронологию, географию и динамику распространения инфекции. В связи с этим при выборе метода проведения филогенетических исследований вирусов предпочтение отдается байесовским методам. Статьи, описывающие программное обеспечение, реализующее различные варианты и способы применения этих методов, процитированы десятки тысяч раз. Применение байесовских методов в филогенетике предполагает адекватный подбор моделей, параметров расчетов и исходных данных, что требует проведения тщательного предварительного анализа.

В данном обзоре приведено описание основных этапов проведения филогенетического анализа, принципы работы методов статистической филогенетики, способы подготовки данных для анализа, критерии выбора эволюционных моделей для исследования и примеры применения методов на практике.

Методы филогенетического анализа в вирусологии

Филогенетический анализ позволяет выяснить отношения родства между разными группами вирусов на основании сравнения нуклеотидных последовательностей. Выделяются несколько этапов выполнения филогенетического анализа: создание репрезентативной выборки, выравнивание последовательностей, выявление взаимоотношений между разными вирусами [1].

Установить отношения родства, или филогенетические взаимоотношения, между объектами изучения можно только в том случае, если существует общий предок этих объектов. Для вирусов характерно заимствование генетических элементов из других организмов (негомологичная рекомбинация), поэтому геномы даже близкородственных вирусов могут иметь негомологичные, то есть неродственные участки, непригодные для филогенетического анализа. Если имеются данные о негомологичности участков вирусного генома, выравнивание и дальнейший анализ таких участков будут грубой, но достаточно распространенной ошибкой.

Изменения в вирусном геноме могут носить характер точечных мутаций, вставок и делеций. В изучаемых последовательностях должны существовать незначительно изменившиеся участки, которые позволят установить их общее происхождение. Процесс выравнивания последовательностей заключается в поиске такого взаимного расположения разных фрагментов нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, при котором наименее измененные участки находятся в одном и том же положении относительно друг друга. Алгоритмы выравнивания являются отдельным направлением биоинформатики [59, 72]. В практике наиболее широко распространены методы прогрессивного выравнивания (например, Clustal [37], T-Coffee [60]). При использовании этих методов сначала строится матрица сходств последовательностей, затем выполняется попарное выравнивание для самых близких пар последовательностей, после чего происходит последовательное выравнивание новых последовательностей с зафиксированными первыми попарными выравниваниями. Недостатком такого подхода является невозможность исправления ошибок, которые могут возникать на любом этапе выполнения анализа, что особенно значимо при сравнении генетически далеких друг от друга последовательностей. Этого можно избежать, используя итеративные методы прогрессивного выравнивания (например, MAFFT [45], MUSCLE [27]). Сначала методом прогрессивно-

го выравнивания создается первое множественное выравнивание, затем в цикле выполняется несколько итераций улучшения выравнивания, что приводит, с одной стороны, к более достоверному результату, а с другой — к повышению требований к вычислительным мощностям. При сравнении менее близкородственных вирусов более точные результаты выравнивания могут быть получены при анализе менее вариабельных аминокислотных последовательностей, в то время как обычно для анализа используют нуклеотидные последовательности. Поэтому на практике часто прибегают к выравниванию нуклеотидных последовательностей на основе кодируемой ими аминокислотной последовательности (translation-based alignment). Такой способ выравнивания реализован в программе TranslatorX [2].

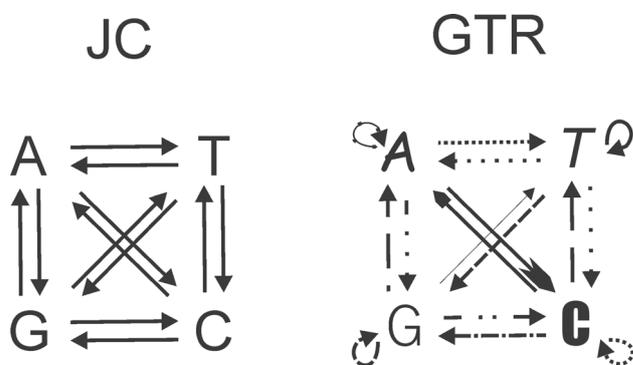


Рисунок 1. Модель Джукса–Кантора (JC) является самой простой (частной) моделью эволюции нуклеиновых кислот — предполагаются равные частоты нуклеотидов и равные вероятности возникновения замен (одинаковые стрелки). Модель GTR является самой сложной (общей) моделью эволюции нуклеиновых кислот — предполагаются разные частоты нуклеотидов (разные шрифты) и разные вероятности возникновения замен (разные прямые стрелки). Кроме того, модель GTR допускает замены типа A-на-A, T-на-T, C-на-C, G-на-G (разные круговые стрелки), которые возможны в результате нескольких последовательных замен в одной и той же позиции генома

Figure 1. The Jukes–Cantor (JC) model is the simplest (particular) model for the evolution of nucleic acids — equal nucleotide frequencies and equal probability of substitution (identical arrows) are assumed. The GTR model is the most complex (general) model for the evolution of nucleic acids — different nucleotide frequencies (different fonts) and different probabilities of substitutions (different straight arrows) are assumed. In addition, the GTR model assumes substitution A-on-A, T-on-T, C-on-C, G-on-G (different circular arrows), which are possible as a result of several consecutive replacements at the same genome position

Подавляющее большинство современных методов филогенетического анализа основаны на сопоставлении нуклеотидных или аминокислотных дистанций между последовательностями. Расчет дистанций имеет смысл только для выравненных последовательностей. В простейшем варианте дистанция рассчитывается для каждой возможной пары последовательностей из выборки как доля различающихся нуклеотидов/аминокислот между этими последовательностями. Существуют разные способы расчета дистанций, что обусловлено использованием разных моделей эволюции нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. Так, например, наиболее частая модель Джукса–Кантора (Jukes and Cantor 1969, JC) [42] (рис. 1) подразумевает равную частоту всех нуклеотидов и равную вероятность возникновения всех замен в последовательностях. Другие модели в разной степени учитывают эти два ключевых параметра (4 частоты нуклеотидов, 16 типов замен). На рис. 1 представлены самая простая (JC) и самая сложная (GTR) модели эволюции нуклеиновых кислот. Высокое разнообразие моделей эволюции нуклеотидных последовательностей вызвано тем, что по биологическим причинам для организмов характерны разные варианты отношений частот нуклеотидов и скоростей накопления замен. Применимость модели к конкретному набору последовательностей можно оценить при помощи вычисления соответствующих показателей совместимости, например информационного критерия Акаике (AIC, Akaike Information Criterion) [3] или байесовского информационного критерия (BIC, Bayesian Information Criterion) [68], реализованных во многих пакетах для филогенетического анализа. Для расчета аминокислотных дистанций чаще всего используют эмпирические модели, основанные на информации о наблюдаемых частотах аминокислот и вероятностях каждой возможной замены аминокислоты [6].

Наиболее часто используемым методом построения филогенетических деревьев на основе матрицы дистанций является метод присоединения соседей (neighbor joining, NJ) [67]. Принцип его работы заключается в поэтапном поиске пары соседних последовательностей, которые минимизируют общую длину ветвей дерева. Другими словами, сначала идентифицируют ту пару последовательностей, при объединении которой в один таксон длина всех ветвей дерева минимальна. Затем рассчитывают дистанцию между оставшимися последовательностями и общим узлом объединенной пары. Такой цикл повторяют, пока все последовательности не присоединят поэтапно. Филогенетическая реконструкция при помощи

метода присоединения соседей является одним из самых быстрых вариантов выполнения анализа [50].

Другой класс методов филогенетического анализа применяется для расчета наиболее вероятные значения параметров эволюционной модели и топологии филогенетического дерева. К этой категории относятся байесовские методы статистического анализа, которые подробно разбираются в следующем разделе, а также построение филогенетического дерева по принципу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) [31]. Этот метод основан на поиске такого филогенетического дерева, при котором вероятность наблюдать исследуемое выравнивание нуклеотидных или аминокислотных последовательностей максимальна. Применение группы таких методов требует значительных вычислительных мощностей.

В ряде работ проводилось сравнение разных методов филогенетического анализа на одинаковых данных. Топология деревьев, полученных разными методами, сопоставлялась с топологией истинного дерева. В публикации Джозефа Фельзенштейна, первым описавшего применение метода максимального правдоподобия, показано, что в большинстве случаев ML демонстрировал правильную топологию дерева чаще других методов. Тем не менее при анализе коротких последовательностей метод NJ оказался предпочтительнее [50]. В аналогичной работе, выполненной Масатоси Нэи, автором метода NJ, делается вывод, что оба метода имеют сопоставимую точность в контексте определения верной топологии дерева [81].

Основные принципы работы байесовских методов статистической филогенетики

Основу байесовских методов статистической филогенетики составляет теорема, сформулированная Томасом Байесом. Теорема Байеса позволяет оценить неизвестные параметры исследуемого явления на основании наблюдений. Результат такой оценки называется байесовским выводом. Например, известно, что в ящике находится какое-то животное. Необходимо определить, какое животное спрятано. Если из ящика слышно мяуканье, то можно сделать вывод, что в ящике, скорее всего, находится кот. Другими словами, сведения об исследуемом явлении, известные априори (то есть до опыта — «в ящике животное», «чаще всего мяукают коты»), можно уточнить на основании знаний, полученных после проведения опыта (апостериори — «мяукает»). Этот подход отличается от обычной описательной статистики, которая

отвечает на вопросы типа «Если в ящике кот, с какой вероятностью будет слышно мяуканье?» и позволяет объединять в одном результате много итераций опыта.

Применение методов байесовского анализа в филогенетике впервые было предложено примерно 25 лет назад [64]. В случае байесовской филогенетики наблюдаемыми данными являются генетические последовательности исследуемых вирусов, а эволюционная модель для таких последовательностей включает модель замен, модель молекулярных часов, описывающую скорости накопления замен на ветвях дерева, филогенетическое дерево и модель, описывающую его ветвление (демографическая модель). Таким образом, результатом байесовского вывода является наиболее вероятное филогенетическое дерево и совокупность значений параметров эволюционной модели при условии имеющегося выравнивания генетических последовательностей. Помимо генетических последовательностей, в качестве априорных данных, то есть известных независимо от эксперимента, можно использовать географические координаты мест выделения последовательностей, время сбора содержащего последовательности материала, информацию о животном — хозяине вируса и т. п. Благодаря этому можно определять хронологию основных событий в эволюции вируса, воспроизводить историю географического распространения как патогена в целом, так и отдельных групп вируса.

Ключевой особенностью байесовских методов является возможность одновременного изучения целостной модели эволюции, включающей все ее параметры. Данное свойство выгодно отличает этот класс алгоритмов от «классических» методов молекулярной филогении, где используется последовательный расчет эволюционных параметров.

Для расчета апостериорных распределений параметров модели в байесовских методах используются алгоритмы Монте-Карло с цепями Маркова (MCMC, Markov Chain Monte Carlo) [58]. Алгоритм MCMC выполняется в несколько этапов. Для каждой переменной (параметра анализа) исследуется пространство вероятностного распределения. Как правило, первоначальное состояние переменной (например, скорость замен A в G) выбирается произвольно. Затем рассчитывается вероятность того, что это значение справедливо при заданных условиях. После этого случайным образом изменяется состояние переменной. Рассчитывается вероятность справедливости нового состояния, а затем сравнивается с предыдущим значением. Если вероятность справедливости второго состояния выше, чем у первого, будет подтвержден переход переменной из первого состояния

во второе, если ниже — переход маловероятен. Такой процесс повторяется миллионы раз, благодаря чему осуществляется поиск наиболее вероятного значения каждой исследуемой переменной. Естественно, вследствие многократного выполнения шагов в пространстве возможных состояний расчет наиболее вероятного значения для всех исследуемых параметров является вычислительно затратным процессом. Следует отметить, что с помощью байесовских методов вычисляется не конкретное значение каждой переменной, а вероятностное распределение значений переменной, для которого возможно определить величину медианы и доверительного интервала.

Выбор модели для филогенетического анализа

Эволюционную модель можно рассматривать как способ формализации наблюдаемых закономерностей возникновения исследуемых последовательностей. Эволюционные модели различаются количеством учитываемых параметров. Более сложные модели лучше описывают данные, но избыточное количество параметров может приводить к большим вычислительным нагрузкам, а также к лишним биологическим смыслам результатам. При выборе модели необходимо сохранять баланс между числом параметров и ее способностью описывать биологические данные.

Результаты любого филогенетического анализа зависят от допущений использованной модели. Если модель плохо описывает биологические данные, то результаты могут оказаться ошибочными. Например, филогенетическая модель, предполагающая постоянную скорость накопления замен в разных участках последовательностей, приводит к некорректным результатам, когда скорость накопления замен неравномерна. При этом искаженный результат может получиться, даже если остальные параметры модели верны [33].

На практике только на основании полученных результатов филогенетического анализа невозможно определить, являются они верными или нет. Для этого требуется, в частности, анализ соответствия выбранной эволюционной модели исследуемым объектам. Обязательным этапом при формулировании результатов является обоснование выбранной модели. Если в публикации не приведено описание этапа выбора модели, то приведенные в ней результаты могут трактоваться неоднозначно.

Байесовские филогенетические методы позволяют использовать филогенетические модели разной сложности. Универсальной модели, подходящей для любого случая, не существует.

В байесовской филогенетике для сравнения моделей применяется подход, основанный на вычислении коэффициента Байеса (Bayes Factor, BF) [70, 80]. BF — это отношение вероятностей данных при условии выбора разных моделей,

$$BF = \frac{P(D|M1)}{P(D|M2)},$$

где D — это данные; M1 — первая модель; M2 — вторая модель; P(D|M1) и P(D|M2) — вероятности наблюдения данных при условии использования первой модели и второй модели соответственно [40].

Для выбора модели эволюции принято использовать десятичный логарифм коэффициента Байеса — $\log BF$. Если $\log(BF)$ принимает значение от 0 до 1, то значимой разницы между моделями нет. Значения $\log(BF)$ более 1 свидетельствуют о превосходстве M1 над M2 [44], однако на практике достаточно значимой разницей между моделями считают значения $\log(BF)$ больше 10. Сравнение моделей эволюции при помощи $\log(BF)$ является вычислительно чрезвычайно затратным и требует значительного объема «ручной» работы по перебору параметров.

Для приближенного вычисления вероятности P(D|M) достаточной точностью отличаются методы path sampling (PS) [52], stepping stone (SS) [89] и generalized stepping stone (GSS) [29]. Они реализованы в программах BEAST [24] и BEAST2 [11]. Недостатком данных методов является необходимость подбора параметров при каждом исследовании и большая вычислительная сложность. Альтернативой данным методам является алгоритм вложенного выбора (nested sampling, NS) [66, 71], который, в отличие от других, позволяет вычислять стандартное отклонение для P(D|M). Он реализован в программе BEAST2 [66].

Выбор модели замен. Выбор модели замен осуществляется во время подготовки к исследованию при помощи отдельных биоинформатических инструментов (например, jModelTest, ModelGenerator [46], PartitionFinder2 [51]). Следует отметить, что скорость накопления мутаций для нуклеотидов, стоящих в разных позициях кодона, может отличаться. По этой причине при анализе белок-кодирующих последовательностей целесообразно подбирать наиболее подходящую модель замен для каждой позиции кодона по отдельности. В противном случае топология филогенетического дерева может оказаться некорректной [43]. Программа PartitionFinder2 позволяет найти оптимальную модель замен для каждой позиции кодона. Другой подход для выбора модели замен — bModelTest [12], ставший частью программного пакета BEAST2: в этом случае модель замен используется в качестве параметра

байесовского вывода. В процессе анализа цепь Маркова может переходить с одной модели на другую. При этом, чем дольше цепь находится на одной из моделей замен, тем такая модель предпочтительнее. Разные модели поддерживаются в разной степени, что учитывают при итоговой оценке всех параметров.

Выбор модели молекулярных часов. Согласно концепции молекулярных часов, предложенной в 1960-х годах [56, 94, 95], замены в родственных нуклеотидных или аминокислотных последовательностях происходят с практически постоянной скоростью. Если раньше знания о времени эволюционных событий основывались только на ископаемых данных, то благодаря этой концепции стало возможно определять время существования общих предков организмов, используя генетические последовательности.

В целом существующие модели молекулярных часов можно классифицировать на основе количества параметров, описывающих скорости накопления замен на ветвях [39]. Самая первая и простейшая модель молекулярных часов предполагала постоянную скорость эволюции для разных таксонов [94]. Это означает, что генетическое расстояние между последовательностями организмов линейно зависит от времени с момента расхождения организмов. Данную модель также называют строгими молекулярными часами (strict clock). В результате увеличения числа генетических последовательностей было получено немало свидетельств того, что скорости накопления замен в разных группах организмов сильно варьируются. В таком случае простая модель, предполагающая постоянную скорость замен, недостаточно точно отражает реальные события [86]. В модели ослабленных молекулярных часов (relaxed molecular clock) предполагается, что на каждой ветви филогенетического дерева свое значение скорости накопления замен, то есть число параметров равно числу ветвей дерева [22]. Третья группа моделей допускает число различных скоростей замен в диапазоне между единицей (то есть строгие часы) и числом ветвей дерева (ослабленные часы). К таким моделям относится модель локальных молекулярных часов [25], предполагающая, что скорости внутри определенного числа клад филогенетического дерева постоянные, но отличаются между кладами. Эту модель целесообразно использовать при изучении нескольких таксонов, предполагая, что внутри таксонов скорость накопления замен постоянна.

Выбор модели молекулярных часов проводят при помощи вычисления коэффициента Байеса. Если используемая модель плохо описывает данные, то это критически сказывается на полученных сведениях о времени расхождения групп вирусов [87]. При сравнении разных

моделей необходимо включать в рассмотрение модель строгих часов. Если гипотезу о том, что скорость накопления замен постоянна, нельзя отвергнуть, строгие молекулярные часы предпочтительнее более сложных моделей молекулярных часов, так как у данной модели самое малое число параметров и, соответственно, меньше время расчетов и доверительные интервалы результатов.

Выбор модели динамики численности популяции. Одной из частей эволюционной модели в байесовских филогенетических методах является модель ветвления дерева (tree prior). Такие модели описывают вероятностные законы образования новых клад в дереве, а также устанавливают априорные распределения на топологию и длины ветвей филогенетического дерева. Ветвление филогенетического дерева косвенно может говорить о динамике численности популяции. Как правило, в программах, реализующих байесовский филогенетический вывод, используются три стохастические модели ветвления: коалесцентные модели, модель рождения–гибели и модель видообразования Юла [92].

Теория слияния, или коалесценции (coalescence), предложенная Кингманом в 1982 г. [48], является способом описания того, как популяционные процессы определяют форму генеалогии исследуемых последовательностей (топологию дерева). При использовании теории коалесценции чаще всего применяют три демографические модели. Самая простая модель предполагает постоянный размер популяции (constant size). Модель экспоненциального роста (exponential growth) [36] подразумевает экспоненциальный рост размера популяции на протяжении всего времени. Модель байесовского графика горизонта (Bayesian skyline plot) [21] позволяет реконструировать апостериорное распределение эффективного размера популяции во времени.

Ключевой величиной, которая характеризует распространение инфекции (и репродукцию любого организма в общем виде), является базовое число репродукции R_0 , то есть ожидаемое количество вторичных инфекций, вызванных одним первичным случаем в полностью восприимчивой популяции [4]. Эта величина определяет скорость распространения вируса без вмешательства и то, какие вмешательства необходимы для сдерживания эпидемии и какой размер иммунной прослойки (доля вакцинированных или переболевших) позволит контролировать распространение вируса [47]. При помощи методов статистической филогенетики в вирусологии можно определить скорости изменения размера популяции по наблюдаемому набору последовательностей генов, отобранных из этой популя-

ции [61]. Применение коалесцентных моделей оправдано при значениях R_0 , близких к 1 (что редко встречается в микробиологии), и плохо подходит для воспроизводства филогенетики вирусной популяции, если экспоненциальный рост размера популяции происходит стохастично [76]. В таких случаях следует использовать модель «рождение–гибель» (birth–death) [75, 77]. Модель «рождение–гибель» позволяет вычислить скорости появления и вымирания групп в популяции [60]. В этой модели присутствуют два параметра: скорость ветвления и скорость вымирания группы. Событию «рождение» соответствует ветвление филогенетического дерева, а событию «гибель» — лист дерева. В программе BEAST2 доступны расширения коалесцентной модели и модели рождения и гибели, включающие эпидемиологическую модель SIR (Susceptible–Infected–Recovered) [75, 84]. Модель SIR описывает динамику групп восприимчивых, инфицированных и выздоровевших индивидов при эпидемии. Также в BEAST2 доступна модель рождения и смерти BDSKY [74], позволяющая оценить эффективное число репродукции R_e , которое отражает динамику R в течение вспышки заболевания. Изменение эффективного числа репродукции позволяет судить об эффективности противоэпидемических мер: если значение R_e ниже 1, то число случаев заболеваний будет снижаться.

Модель Юла описывает процесс видообразования [92]. Единственный параметр этой модели — скорость возникновения нового вида — определяет скорость, с которой ветвь разделяется на две другие ветви. При филогенетическом анализе набора видов целесообразно включить такую модель в перечень моделей для сравнения в первую очередь, поскольку она не требует сложных вычислений.

С одной стороны, выбор демографической модели зависит от цели исследования. Например, при исследовании видообразования используют модель Юла и модель рождения и смерти. В случае исследования эволюции патогенов во время эпидемии целесообразно использовать коалесцентную модель или модель рождения и смерти, включающую эпидемиологическую модель. С другой стороны, выбранный процесс ветвления определяет топологию дерева и другие его параметры [15]. Например, при использовании коалесцентной модели с постоянной численностью популяции возраст корня дерева будет старше, чем у дерева, построенного при условии экспоненциального роста численности. Таким образом, перед анализом необходимо выбрать несколько моделей, потенциально подходящих для цели исследования, и сравнить их с помощью вычисления коэффициента Байеса.

Данные, используемые в байесовском филогенетическом анализе, и особенности их подготовки

Главным источником данных при филогенетическом анализе являются выравнивания нуклеотидных или аминокислотных последовательностей вирусов. Возможно использовать выравнивания как полных геномов, так и одного или нескольких вирусных белков. Анализ выравниваний длинных геномных фрагментов следует проводить с особенной осторожностью, так как для большинства вирусов характерна рекомбинация, или горизонтальный обмен генетической информацией. В результате негомологичной рекомбинации (то есть с ДНК/РНК других организмов) фрагменты генома одного вируса могут иметь разное происхождение, что исключает возможность корректного выравнивания последовательностей РНК/ДНК. В случае гомологичной рекомбинации фрагменты генома будут иметь разную филогенетическую историю, что также затрудняет проведение

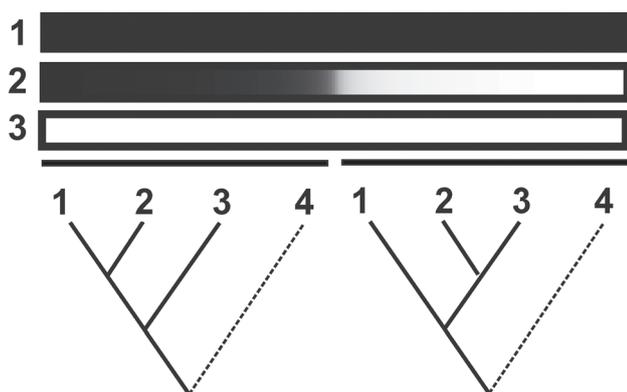


Рисунок 2. Влияние рекомбинации на топологию филогенетического дерева. Последовательность 2 — результат рекомбинации последовательностей 1 и 3. Одинаковым цветом выделены похожие участки последовательностей. Укорененные филогенетические деревья, построенные по разным участкам генома, иллюстрируют отношения между последовательностями. Топология деревьев изменяется из-за использования участков генома разного происхождения [34]

Figure 2. The effect of recombination on the topology of the phylogenetic tree. The sequence 2 is the result of the recombination of sequences 1 and 3. Similar fragments of sequences are highlighted in the same color. Rooted phylogenetic trees built on different parts of the genome illustrate the relationship between sequences. Tree topology is changing due to the use of genome fragments of different origin [34]

филогенетического анализа (рис. 2). Таким образом, оказывается невозможным определить единственное положение рекомбинанта на дереве и другие параметры эволюции — различные участки генома будут иметь разные эволюционные события (рис. 2). По этой причине вклад рекомбинационных событий в эволюцию исследуемых вирусов требует внимательного изучения до начала анализа [82].

В целом, перед филогенетическим анализом необходимо исключить события рекомбинации с помощью набора алгоритмов для ее детекции, реализованных, например, в программе RDP4 [57].

Байесовские филогенетические методы позволяют строить филогенетические деревья во временной шкале. Для этого, помимо нуклеотидных последовательностей, используют даты выделения вирусов [22, 77]. Использование дат выделения вирусосодержащего материала возможно только в том случае, если исследуемая выборка последовательностей содержит временной сигнал. Это значит, что между двумя последовательностями изолятов, выделенных из вирусной популяции в разное время, должно быть измеримое различие нуклеотидных или аминокислотных замен [23, 63]. Для изучения временной структуры выборки последовательностей используют подход, основанный на регрессионном анализе. Сначала строят укорененное филогенетическое дерево любым из «классических» способов, описанных ранее (например, методом максимального правдоподобия). Длины ветвей такого дерева должны отражать количество генетических различий. Затем строят линейную регрессию между датами выделения вирусов и расстоянием от корня до листьев, соответствующих вирусным последовательностям. При наличии временной структуры наблюдается корреляция между данными величинами, а отсутствие линейного тренда говорит о том, что данные не подходят для байесовского филогенетического анализа с использованием моделей молекулярных часов. Анализ временной структуры популяции реализован в программе TempEst [63].

Разрешение вырожденных нуклеотидов. Качество выравнивания нуклеотидных или аминокислотных последовательностей играет решающую роль в байесовском филогенетическом анализе. При секвенировании вирусных последовательностей некоторые позиции могут иметь неоднозначную расшифровку. Неопределенность позиций связана как с техническими ограничениями при секвенировании, так и с тем, что РНК-вирусы существуют в виде квазивидов, когда каждый образец вируса представляет собой облако почти идентичных геномов, которые отличаются несколькими заменами [19]. В резуль-

тате некоторые позиции в вирусных последовательностях, доступных в базах данных нуклеотидов (например, GenBank), имеют неоднозначные значения, обозначенные кодами IUPAC (Y для T/C, R для G/A и т. д.). Иногда такие последовательности существенно искажают результаты филогенетического анализа [82]. Если в последовательности много вырожденных нуклеотидов, то это, скорее всего, является результатом низкого качества секвенирования, и такую последовательность следует исключить из набора данных. Единичные вырожденные нуклеотиды можно разрешать по консенсусу. Алгоритм для автоматизации этого процесса был предложен в статье Vakulenko Yu. и соавт. [82] и доступен по адресу https://github.com/v-julia/resolve_ambiguous. Также желательно вручную проверять выравнивание последовательностей на наличие ошибок секвенирования, например сдвигов открытых рамок считывания, так как такие ошибки влияют на результаты анализа.

Выбор последовательностей при полномасштабном анализе

Для выполнения филогенетического анализа необходимо соблюдение условия репрезентативности исследуемой выборки. Количество доступных последовательностей в базах данных значительно различается для разных видов вирусов. Для вирусов, имеющих большое медицинское значение, доступны десятки тысяч последовательностей. Для менее изученных вирусов число последовательностей на несколько порядков меньше. Чаще всего последовательности получали в результате исследований вспышек вируса или в ходе надзора в конкретном регионе. В результате этого распределение данных по годам и регионам выделения неравномерно даже для хорошо описанных вирусов. Таким образом, доступное число последовательностей редко соответствует реальному разнообразию вирусной популяции.

Анализ тысяч последовательностей вирусов затруднителен из-за вычислительной сложности. Объем выборки для анализа может быть целенаправленно сокращен при условии сохранения генетического разнообразия и проведения контроля влияния сокращения на результат исследований. Одним из способов формирования выборки может быть удаление почти идентичных последовательностей. Такая возможность реализована в различных программах: Jalview [85], CD-HIT [32], UCLUST [28], skipredundant из пакета программ EMBL [65]. При этом сохраняется максимальное генетическое разнообразие последовательностей. Кроме того, вычисленные скорости замен и возрасты корней деревьев совпадают чаще, чем при слу-

чайном выборе последовательностей. С другой стороны, удаление похожих последовательностей может стать причиной артефактов — например, при расчете динамики численности вирусной популяции [82].

При другом способе уменьшения размера выборки среди последовательностей выделяют группы, которые соответствуют отдельным исследованиям. Затем в итоговую выборку включают все последовательности из небольших исследований и небольшую часть последовательностей из крупных научных исследований, в которых обычно изучается большое количество последовательностей из одного региона. При таком способе вероятность сохранения редких последовательностей выше, и результаты анализа искажаются в меньшей степени [82].

Эффект от использования выборок разного объема, оказываемый на результаты исследования, можно оценить путем симулирования. Для энтеровируса A71 нами была смоделирована ситуация, при которой известна только часть из почти 5000 опубликованных последовательностей [83]. При размере выборки 150–400 последовательностей результаты расчета скорости накопления замен и возраста корней филогенетических деревьев различались в несколько раз. Аналогичные результаты были получены при филогенетическом анализе вируса клещевого энцефалита [17]. Таким образом, неполноценность выборок влияет на оценки ключевых эволюционных параметров в случае анализа небольших наборов данных. При этом размер возможной ошибки в принципе нельзя оценить, если имеется лишь небольшая выборка известных последовательностей вируса, и результат следует интерпретировать с особой осторожностью.

Примеры применения байесовских филогенетических методов на практике

Байесовские филогенетические методы позволяют строить филогенетические деревья во временной шкале. Это делает возможным восстановление хронологии основных событий в эволюции вируса. Следует отметить, что подобные оценки находятся в соответствии с данными эпидемиологической статистики. Например, в Центральной Европе бешенство среди лисиц практически не регистрировалось перед Второй мировой войной. При этом в степной зоне европейской части СССР в середине 1930-х годов были описаны массовые случаи гибели лисиц по неустановленной причине [9]. В 1939-м году на территории Польши произошла вспышка бешенства среди этих животных [5]. Впоследствии зарегистрировали миграцию бешеных лисиц в западном направ-

лении со средней скоростью 30–60 км в год. В 1968 году бешенство среди лисиц появилось во Франции. Из этих наблюдений можно сделать вывод о том, что бешенство среди лисиц в Западной Европе возникло примерно в годы Второй мировой войны. Согласно результатам байесовского филогенетического анализа, данная группа вирусов бешенства возникла в 1939 году [18].

В ряде исследований используют филогенетические деревья для объединения генетических данных и информации о распределении популяции в пространстве [7]. Такой анализ, позволяющий расследовать вспышки инфекционных заболеваний, называется филогеографическим. Разные модели филогеографии реализованы в программах BEAST [79] и BEAST2 [13]. В зависимости от задачи и доступных данных возможно использование как точных координат мест получения вирус-содержащего материала [10, 54], так и названий населенных пунктов [53, 55]. Например, при анализе последовательностей ВИЧ глобально распространенной группы М байесовскими методами филогеографического анализа было показано, что последний общий предок этих вирусов с вероятностью 99% возник в окрестностях города Киншаса (Демократическая Республика Конго) [30].

В байесовский филогенетический анализ можно ввести и другие характеристики исследуемых вирусов. Существуют примеры использования данных о хозяевах вирусов для изучения роли смены хозяев в эволюции вируса птичьего гриппа [91] и MERS-CoV [26]. Так, например, серотип вируса гриппа H9N2, скорее всего, возник у диких уток [91]. Судя по всему, это случилось в Гонконге в конце 60-х годов XX века. После этого происходило несколько независимых заносов вируса в популяцию домашней курицы, от которых заражались люди. Считается, что этот серотип вируса гриппа потенциально может вызвать пандемию [73].

Методы статистической филогенетики могут использоваться и для расследования неестественных событий в эволюции вирусов (естественное или умышленное внесение вируса в циркуляцию, антропогенный перенос вирусов). В 2008–2015 гг. в Китае произошла вспышка энтеровирусного везикулярного стоматита. Всего заболело почти 14 млн человек. По некоторым оценкам, 40% случаев были вызваны энтеровирусом типа A71 (EV-A71) [90]. При этом из 2308 летальных случаев 2136 были вызваны EV-A71. Часть вирусов EV-A71, выделенных в ходе этой эпидемии, принадлежала к генотипу А [93]. Ближайшим родственником таких вирусов оказался культивируемый в лабораториях «прототипный» штамм BrCr, выделенный в США в начале 1970-х гг., который

не встречается в циркуляции. При помощи байесовского анализа показали, что скорость возникновения замен в вирусах генотипа А EV-A71 статистически значимо отличается от среднего значения для EV-A71 в целом [83]. Это указывает на реинтродукцию вируса BrCr в окружающую среду из лаборатории.

При изучении эволюции и эпидемиологии РНК-содержащих вирусов необходимо учитывать возможные изменения размера популяции патогена, зависящие от эффективного числа репродукции — R_e . Рост размера популяции является маркером «успешного» распространения инфекции и повышения генетического разнообразия вируса. Байесовские методы филогенетического анализа позволяют воспроизвести динамику этого параметра во времени [21, 38, 74]. Так, например, было показано, что число заражений вирусом гепатита С (ВГС) в Египте резко увеличилось на несколько порядков в середине XX века [62]. После этого происходило плавное незначительное снижение эффективного размера популяции ВГС. Резкий рост новых случаев связывают с началом лечения шистосомоза. Лекарство вводили при помощи уколов, нестерильные шприцы использовали многократно [21]. Плавное незначительное снижение размера популяции ВГС объясняется постепенным замещением парентеральных антишистосомальных препаратов на лекарства, употребляемые перорально. Таким образом, изучение динамики размера вирусной популяции позволяет оценить влияние среды обитания патогена на распространение инфекции. Под «средой обитания патогена» мы подразумеваем совокупность большого числа социальных, географических и эпидемиологических факторов. Например, в различных сообществах люди предпочитают разную дистанцию. Это влияет на распространение инфекций, передающихся воздушно-капельным путем. Климатические условия серьезно различаются в разных регионах. Считается, что сезонность в распространении гриппа по большей части обусловлена колебаниями абсолютной влажности [69]. Кроме того, на вероятность передачи инфекции влияют принятые регуляторными организациями меры эпидемиологического контроля. Эффект каждого из подобных факторов на распространение инфекции можно оценить при помощи изучения динамики размера вирусной популяции.

Заключение

Байесовские методы филогенетического анализа нашли широкое применение в изучении эволюции вирусов. Этот набор методов был использован в десятках тысяч исследований,

описывающих разные аспекты возникновения и распространения инфекционных заболеваний человека и животных. Относительно недавно появились программные пакеты, позволяющие не обладающему специальной биоинформатической компетенцией исследо-

вателю восстановить хронологию и географию распространения вирусов при помощи методов байесовской филогенетики. Тем не менее корректные результаты можно получить только в случае грамотного выбора всех влияющих на анализ параметров.

Список литературы/References

1. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 256 с. [Lukashov V.V. Molecular evolution and phylogenetic analysis. Moscow: BINOM. Laboratoriia Znaniy, 2009. 256 p. (In Russ.)]
2. Abascal F., Zardoya R., Telford M.J. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.*, 2010, vol. 38: W7-13. doi: 10.1093/nar/gkq291
3. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.*, 1974, vol. 19, no. 6, pp. 716–723. doi: 10.1109/TAC.1974.1100705
4. Anderson R.M., May R.M. Population biology of infectious diseases: part I. *Nature*, 1979, vol. 280, no. 5721, pp. 361–367. doi: 10.1038/280361a0
5. Anderson R.M., May R.M., Jackson H.C., Smith A.M. Population dynamics of fox rabies in Europe. *Nature*, 1981, vol. 289, no. 5800, pp. 765–771. doi: 10.1038/289765a0
6. Arenas M. Trends in substitution models of molecular evolution. *Front. Genet.*, 2015, vol. 6: 319. doi: 10.3389/fgene.2015.00319
7. Avise J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.*, 2009, vol. 36, no. 1, pp. 3–15. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
8. Berry I.M., Ribeiro R., Kothari M., Athreya G., Daniels M., Lee H.Y., Bruno W., Leitner T. Unequal evolutionary rates in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pandemic: the evolutionary rate of HIV-1 slows down when the epidemic rate increases. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 19, pp. 10625–10635. doi: 10.1128/jvi.00985-07
9. Botvinkin A., Kosenko M. Rabies in the european parts of Russia, Belarus and Ukraine. In: Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean Basin: a testament to rabies. *OIE: Paris, France, 2004*, pp. 47–65.
10. Bouckaert R. Phylogeography by diffusion on a sphere: whole world phylogeography. *Peer J.*, 2016, vol. 4: e2406. doi: 10.7717/peerj.2406
11. Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A.J. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.*, 2014, vol. 10, no. 4, pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537
12. Bouckaert R.R., Drummond A.J. bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evol. Biol.*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1186/s12862-017-0890-6
13. Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., Heled J., Jones G., Kühnert D., Maio De N., Matschiner M., Mendes F.K., Müller N.F., Ogilvie H.A., Plessis du L., Poppinga A., Rambaut A., Rasmussen D., Siveroni I., Suchard M.A., Wu C.H., Xie D., Zhang Ch., Stadler T., Drummond A.J. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.*, 2019, vol. 15, no. 4: e1006650. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006650
14. Choudhuri S. Phylogenetic Analysis. In: Bioinformatics for Beginners. *Elsevier*, 2014. pp 209–218.
15. Colijn C., Plazzotta G. A Metric on phylogenetic tree shapes. *Syst. Biol.*, 2018, vol. 67, no. 1, pp. 113–126. doi: 10.1093/sysbio/syx046
16. Dayrat B. The roots of phylogeny: how did haeckel build his trees? *Syst. Biol.*, 2003, vol. 52, no. 4, pp. 515–527. doi: 10.1080/10635150390218277
17. Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Vakulenko Yu.A., Karganova G.G., Lukashev A.N. Tick-Borne encephalitis virus: an emerging ancient zoonosis? *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 2: 247. doi: 10.3390/v12020247
18. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., Karganova G.G., Galkina I.V., Shchelkanov M.Yu., Shipulin G.A. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 2: e0171855. doi: 10.1371/journal.pone.0171855
19. Domingo E., Sheldon J., Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012, vol. 76, no. 2, pp. 159–216. doi: 10.1128/MMBR.05023-11
20. Drake J.W., Holland J.J. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, vol. 96, no. 24, pp. 13910–13913. doi: 10.1073/pnas.96.24.13910
21. Drummond A.J. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 2005, vol. 22, no. 5, pp. 1185–1192. doi: 10.1093/molbev/msi103
22. Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.*, 2006, vol. 4, no. 5: e88. doi: 10.1371/journal.pbio.0040088
23. Drummond A.J., Pybus O.G., Rambaut A., Roald F., Rodrigo A.G. Measurably evolving populations. *Trends Ecol. Evol.*, 2003, vol. 18, no. 9, pp. 481–488. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00216-7
24. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.*, 2007, vol. 7, no. 1: 214. doi: 10.1186/1471-2148-7-214
25. Drummond A.J., Suchard M.A. Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all. *BMC Biol.*, 2010, vol. 8, no. 1: 114. doi: 10.1186/1741-7007-8-114
26. Dudas G., Carvalho L.M., Rambaut A., Bedford T. MERS-CoV spillover at the camel-human interface. *Elife*, 2018, vol. 7: e31257. doi: 10.7554/eLife.31257

27. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
28. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, no. 19, pp. 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
29. Fan Y., Wu R., Chen M.-H., Kuo L., Lewis P.O. Choosing among partition models in Bayesian phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 1, pp. 523–532. doi: 10.1093/molbev/msq224
30. Faria N.R., Rambaut A., Suchard M.A., Baele G., Bedford T., Ward M.J., Tatem A.J., Sousa J.D., Arinaminpathy N., P epin J., Posada D., Peeters M., Pybus O.G., Lemey P. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, 2014, vol. 346, no. 6205, pp. 56–61. doi: 10.1126/science.1256739
31. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 1981, vol. 17, no. 6, pp. 368–376. doi: 10.1007/BF01734359
32. Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 23, pp. 3150–3152. doi: 10.1093/bioinformatics/bts565
33. Gaut B.S., Lewis P.O. Success of maximum likelihood phylogeny inference in the four-taxon case. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, vol. 12, no. 1, pp. 152–162. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040183
34. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*, 2000, vol. 16, no. 7, pp. 573–582. doi: 10.1093/bioinformatics/16.7.573
35. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S., Park D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga C.B., Malboeuf C.M., Qu J., Gladden A.D., Schaffner S.F., Yang X., Jiang P.P., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnies M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Konuwa E., Saffa S., Sellu J., Jalloh A.A., Kovoma A., Koninga J., Mustapha I., Kargbo K., Foday M., Yillah M., Kanneh F., Robert W., Massally J.L., Chapman S.B., Bochicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheffelin J.S., Lander E.S., Hapji C., Gevaio S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Khan S.H., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, 2014, vol. 345, no. 6202, pp. 1369–1372. doi: 10.1126/science.1259657
36. Griffiths R.C., Tavar e S. Sampling theory for neutral alleles in a varying environment. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. Biol. Sci.*, 1994, vol. 344, no. 1310, pp. 403–410. doi: 10.1098/rstb.1994.0079
37. Higgins D.G., Sharp P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 1988, vol. 73, no. 1, pp. 237–244. doi: 10.1016/0378-1119(88)90330-7
38. Hill V., Baele G. Bayesian estimation of past population dynamics in BEAST 1.10 using the skygrid coalescent model. *Mol. Biol. Evol.*, 2019, vol. 36, no. 11, pp. 2620–2628. doi: 10.1093/molbev/msz172
39. Ho S.Y.W., Duchene S. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Mol. Ecol.*, 2014, vol. 23, no. 24, pp. 5947–5965. doi: 10.1111/mec.12953
40. Jeffreys H. Some tests of significance, treated by the theory of probability. *Math Proc. Cambridge Philos. Soc.*, 1935, vol. 31, no. 2, pp. 203–222. doi: 10.1017/S030500410001330X
41. Jorba J., Campagnoli R., De L., Kew O. Calibration of multiple poliovirus molecular clocks covering an extended evolutionary range. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 9, pp. 4429–4440. doi: 10.1128/JVI.02354-07
42. Jukes T., Cantor C. Evolution of protein molecules. In: Mammalian protein metabolism. *New York: Academic Press*, 1969, pp. 21–132.
43. Kainer D., Lanfear R. The effects of partitioning on phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.*, 2015, vol. 32, no. 6, pp. 1611–1627. doi: 10.1093/molbev/msv026
44. Kass R., Raftery A. Bayes factors. *J. Am. Stat. Assoc.*, 1995, vol. 90, pp. 773–795. doi: 10.2307/2291091
45. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 4, pp. 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
46. Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Al E. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.*, vol. 6: 29. doi: 10.1186/1471-2148-6-29
47. Keeling M.J., Rohani P. Modeling infectious diseases in humans and animals. *New Jersey: Princeton University Press*, 2007. 408 p.
48. Kingman J.F.C. The coalescent. *Stoch. Process. Their Appl.*, 1982, vol. 13, no. 3, pp. 235–248. doi: 10.1016/0304-4149(82)90011-4
49. Koonin E.V., Dolja V.V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: the ultimate modularity. *Virology*, 2015, vol. 479–480, pp. 2–25. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.039
50. Kuhner M.K., Felsenstein J. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.*, 1994, vol. 11, no. 3, pp. 459–468. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040126
51. Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., Calcott B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.*, 2017, vol. 34, no. 3, pp. 772–773. doi: 10.1093/molbev/msw260
52. Lartillot N., Philippe H. Computing bayes factors using thermodynamic integration. *Syst. Biol.*, 2006, vol. 55, no. 2, pp. 195–207. doi: 10.1080/10635150500433722
53. Lemey P., Rambaut A., Drummond A.J., Suchard M.A. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput. Biol.*, 2009, vol. 5, no. 9: e1000520. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000520
54. Lemey P., Rambaut A., Welch J.J., Suchard M.A. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol. Biol. Evol.*, 2010, vol. 27, no. 8, pp. 1877–1885. doi: 10.1093/molbev/msq067
55. Maio De N., Wu C.H., O’Reilly K.M., Wilson D. New routes to phylogeography: a Bayesian structured coalescent approximation. *PLoS Genet.*, 2015, vol. 11, no. 8: e1005421. doi: 10.1371/journal.pgen.1005421
56. Margoliash E. Primary structure and evolution of cytochrome C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1963, vol. 50, no. 4, pp. 672–679. doi: 10.1073/pnas.50.4.672
57. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.*, 2015, vol. 1, no. 1, pp. 1–5. doi: 10.1093/ve/vev003

58. Nascimento F.F., dos Reis M., Yang Z. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nat. Ecol. Evol.*, 2017, vol. 1, no. 10, pp. 1446–1454. doi: 10.1038/s41559-017-0280-x
59. Needleman S.B., Wunsch C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, no. 3, pp. 443–453. doi: 10.1016/0022-2836(70)90057-4
60. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 302, no. 1, pp. 205–217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042
61. Parag K.V., Pybus O.G. Exact Bayesian inference for phylogenetic birth-death models. *Bioinformatics*, 2018, vol. 34, no. 21, pp. 3638–3645. doi: 10.1093/bioinformatics/bty337
62. Pybus O.G. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol. Biol. Evol.*, 2003, vol. 20, no. 3, pp. 381–387. doi: 10.1093/molbev/msg043
63. Rambaut A., Lam T., Carvalho L., Pybus O. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.*, 2016, vol. 2, no. 1: vew007. doi: 10.1093/ve/vew007
64. Rannala B., Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.*, 1996, vol. 43, no. 3, pp. 304–311. doi: 10.1007/PL00006090
65. Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet.*, 2000, vol. 16, no. 6, pp. 276–277. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02024-2
66. Russel P.M., Brewer B.J., Klaere S., Bouckaert R.R. Model selection and parameter inference in phylogenetics using nested sampling. *Syst. Biol.*, 2019, vol. 68, no. 2, pp. 219–233. doi: 10.1093/sysbio/syy050
67. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, vol. 4, no. 4, pp. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
68. Schwarz G. Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.*, 1978, vol. 6, no. 2, pp. 461–464. doi: 10.1214/aos/1176344136
69. Shaman J., Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 9, pp. 3243–3248. doi: 10.1073/pnas.0806852106
70. Sinsheimer J.S., Lake J.A., Little R.J.A. Bayesian hypothesis testing of four-taxon topologies using molecular sequence data. *Biometrics*, 1996, vol. 52, no. 1: 193. doi: 10.2307/2533156
71. Skilling J. Nested sampling for general Bayesian computation. *Bayesian Anal.*, 2006, vol. 1, no. 4, pp. 833–860. doi: 10.1214/06-BA127
72. Smith T.F., Waterman M.S. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 147, no. 1, pp. 195–197. doi: 10.1016/0022-2836(81)90087-5
73. Song W., Qin K. Human-infecting influenza A (H9N2) virus: a forgotten potential pandemic strain? *Zoonoses Public Health*, 2020, vol. 67, no. 3, pp. 203–212. doi: 10.1111/zph.12685
74. Stadler T., Kuhnert D., Bonhoeffer S., Drummond A.J. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, vol. 110, no. 1, pp. 228–233. doi: 10.1073/pnas.1207965110
75. Stadler T., Kouyos R., Wyl V. von, Yerly S., Böni J., Bürgisser P., Klimkait T., Joos B., Rieder P., Xie D., Günthard H.F., Drummond A.J. Estimating the basic reproductive number from viral sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 2012, vol. 29, no. 1, pp. 347–357. doi: 10.1093/molbev/msr217
76. Stadler T., Vaughan T.G., Gavryushkin A., Guindon S., Kühnert D., Leventhal G.E., Drummond A.J. How well can the exponential-growth coalescent approximate constant-rate birth-death population dynamics? *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.*, 2015, vol. 282, no. 1806: 20150420. doi: 10.1098/rspb.2015.0420
77. Stadler T., Yang Z. Dating phylogenies with sequentially sampled tips. *Syst. Biol.*, 2013, vol. 62, no. 5, pp. 674–688. doi: 10.1093/sysbio/syt030
78. Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C.K., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.*, 2016, vol. 24, no. 6, pp. 490–502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003
79. Suchard M., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.*, 2018, vol. 4, no. 1: vey016. doi: DOI:10.1093/ve/vey016
80. Suchard M.A., Weiss R.E., Sinsheimer J.S. Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.*, 2001, vol. 18, no. 6, pp. 1001–1013. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003872
81. Tateno Y., Takezaki N., Nei M. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site. *Mol. Biol. Evol.*, 1994, vol. 11, no. 2, pp. 261–277. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040108
82. Vakulenko Yu., Deviatkin A., Lukashov A. The effect of sample bias and experimental artefacts on the statistical phylogenetic analysis of picornaviruses. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 11: 1032. doi: 10.3390/v11111032
83. Vakulenko Yu., Deviatkin A., Lukashov A. Using statistical phylogenetics for investigation of enterovirus 71 genotype A reintroduction into circulation. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 10: 895. doi: 10.3390/v11100895
84. Vaughan T.G., Leventhal G.E., Rasmussen D.A., Drummond A.J., Welch D., Stadler T. Estimating epidemic incidence and prevalence from genomic data. *Mol. Biol. Evol.*, 2019, vol. 36, no. 8, pp. 1804–1816. doi: 10.1093/molbev/msz106
85. Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M., Clamp M., Barton G.J. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 9, pp. 1189–1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
86. Welch J., Bromham L. Molecular dating when rates vary. *Trends Ecol. Evol.*, 2005, vol. 20, no. 6, pp. 320–327. doi: 10.1016/j.tree.2005.02.007
87. Worobey M., Han G.-Z., Rambaut A. A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. *Nature*, 2014, vol. 508, no. 7495, pp. 254–257. doi: 10.1038/nature13016
88. Worobey M., Watts T.D., McKay R.A., Suchard M.A., Granade T., Teuwen D.E., Koblin B.A., Heneine W., Lemey P., Jaffe H.W. 1970s and 'Patient 0' HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. *Nature*, 2016, vol. 539, no. 7627, pp. 98–101. doi: 10.1038/nature19827
89. Xie W., Lewis P.O., Fan Y., Kuo L., Chen M.H. Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. *Syst. Biol.*, 2011, vol. 60, no. 2, pp. 150–160. doi: 10.1093/sysbio/syq085

90. Yang B., Liu F., Liao Q., Wu P., Chang Z., Huang J., Long L., Luo L., Li Y., Leung G.M., Cowling B.J., Yu H. Epidemiology of hand, foot and mouth disease in China, 2008 to 2015 prior to the introduction of EV-A71 vaccine. *Euro Surveill.*, 2017, vol. 22, no. 50: 16-00824. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.16-00824
91. Yang J., Xie D., Nie Z., Xu B., Drummond A.J. Inferring host roles in Bayesian phylodynamics of global avian influenza A virus H9N2. *Virology*, 2019, vol. 538, pp. 86–96. doi: 10.1016/j.virol.2019.09.011
92. Yule G.U. Mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. *Philos. Trans. R.*, 1924, vol. B213, pp. 21–87.
93. Zhu J., Luo Z., Wang J., Xu Z., Chen H., Fan D., Gao N., Ping G., Zhou Z., Zhang Y., An J. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 2: e56318. doi: 10.1371/journal.pone.0056318
94. Zuckerkandl E., Pauling L. Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity. In: *Horizons in Biochemistry*. New York: Academic Press, 1962, pp. 189–225.
95. Zuckerkandl E., Pauling L. Molecules as documents of history. *J. Theor. Biol.*, 1965, vol. 8, no. 2, pp. 357–366.

Авторы:

Вакуленко Ю.А., младший научный сотрудник, Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия; аспирант биологического факультета, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
Лукашев А.Н., д.м.н., член-корреспондент РАН, директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия; ведущий научный сотрудник, Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия;
Девяткин А.А., к.б.н., старший научный сотрудник, Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия.

Authors:

Vakulenko Yu.A., Junior Researcher, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; PhD-student, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;
Lukashev A.N., PhD, MD (Medicine), RAS Full Member, Director of Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Leading Researcher, Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Deviatkin A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

DEVELOPMENT OF ANTIVIRAL THERAPEUTICS COMBATING COXSACKIEVIRUS TYPE B3 INFECTION

A.S. Volobueva^a, V.V. Zarubaev^a, K.S. Lantseva^b

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Enteroviruses comprise highly diverse group of single-stranded positive RNA viruses belonging to *Enterovirus* genus, *Picornaviridae* family. They are the most prevalent viruses worldwide highlighted by high resistance to environmental cues. Enteroviruses normally cause seasonal self-limiting infections, but also known as causative infectious agents of encephalitis, myocarditis, poliomyelitis, acute heart failure and sepsis. Enterovirus genetic plasticity contributes to widespread epidemics and sporadic outbreaks (e. g., outbreaks of Enterovirus D68 and Enterovirus 71). Type B Coxsackieviruses of Enterovirus B species is one of commonly identified infectious agents associated predominantly with mild upper respiratory and gastrointestinal illnesses. Nevertheless, Coxsackieviruses B3 infection can result in severe myocarditis leading ultimately to heart failure. The pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis is well known being mediated by both direct damage due to viral proteases and indirectly via secondary host immune responses. Despite success in preventive vaccination of some enterovirus infections that allowed to control some of them direct antiviral agents for treatment of enteroviral infection particularly Coxsackieviruses B3 myocardial infection are still in demand. In addition, no ongoing clinical trials for therapy or prevention of Coxsackieviruses B3 infection are available. Current treatment strategies are mainly aimed to stabilize patient condition and relieve discomfort condition. It seems that relatively small market for anti-enteroviral drugs prevents pharma industry from developing new drugs. The Coxsackieviruses B3 lifecycle have been extensively studied and potential targets for drug design have been identified. The aim of our review was to describe current state in the field of antiviral drug design combating Coxsackieviruses B3 infection emphasizing direct-acting antivirals, albeit paying some attention to host factor-targeting inhibitors (including compounds from medicinal plant extracts) as well. The following categories of direct Coxsackieviruses B3 inhibitors are discussed in detail: capsid binders (pleconaril and its derivatives), viral 3C protease inhibitors (rupintrivir and its analogs), drugs targeting viral replication (both nucleoside analogs and non-nucleoside inhibitors). Results of drug repurposing screens for amiloride, benzerazide, dibucaine and fluoxetine are also discussed.

Key words: Enteroviruses, Coxsackievirus, infection, myocarditis, antivirals, drug development, inhibitor.

РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИИ КОКСАКИВИРУСА В3

Волобуева А.С.¹, Зарубаев В.В.¹, Ланцева К.С.²

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Энтеновирусы представляют собой разнообразную группу безоболочечных одноцепочечных по-ложительных РНК-вирусов, принадлежащих к роду энтеровирусов семейства *Picornaviridae*. Они являются

Адрес для переписки:

Волобуева Александрина Сергеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (921) 365-05-48.
E-mail: sasha-khrupina@mail.ru

Contacts:

Aleksandrina S. Volobueva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 365-05-48.
E-mail: sasha-khrupina@mail.ru

Для цитирования:

Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Ланцева К.С. Разработка
противовирусных препаратов для терапии инфекции
коксакивируса В3 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 57–67.
doi: 10.15789/2220-7619-DOA-1273

Citation:

Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Lantseva K.S. Development of antiviral
therapeutics combating coxsackievirus type B3 infection // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1,
pp. 57–67. doi: 10.15789/2220-7619-DOA-1273

наиболее распространенными вирусами в мире и отличаются высокой устойчивостью к факторам внешней среды. Энтеновирусы вызывают сезонные инфекции, а также являются возбудителями энцефалита, миокардита, полиомиелита, острой сердечной недостаточности и сепсиса. Генетическая пластичность энтеровирусов способствует возникновению эпидемий и спорадических вспышек (например, вспышки инфекции энтеровируса D68 или энтеровируса 71). Вирусы Коксаки типа В, принадлежащие к виду энтеровирус В, вызывают преимущественно легкие заболевания верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, но инфекция вируса Коксаки В3 также ассоциирована с развитием миокардита, который, в свою очередь, может привести к сердечной недостаточности. Патогенез миокардита, индуцированного вирусом Коксаки В3, хорошо изучен, он опосредован как прямым повреждением под действием протеаз вируса, так и косвенным повреждением вследствие иммунного ответа организма. Несмотря на успех в области вакцинопрофилактики ряда энтеровирусных инфекций, благодаря которому некоторые из них были взяты под контроль, сохраняется потребность в противовирусных препаратах, активных в отношении энтеровирусов. На сегодняшний день отсутствуют зарегистрированные противовирусные препараты прямого действия для терапии большинства энтеровирусных инфекций, в частности инфекции вируса Коксаки В3. Также не проводятся клинические испытания в области лечения или профилактики инфекции вируса Коксаки В3. Доступные стратегии лечения направлены на стабилизацию состояния пациента и снятию дискомфорта. Вероятно, относительно небольшой рынок препаратов против энтеровирусных инфекций является непривлекательным для фармацевтических компаний. Жизненный цикл вируса Коксаки В3 был тщательно изучен, и известны потенциальные привлекательные мишени для разработки противовирусных препаратов. Целью настоящей работы является обзор текущего состояния области разработки противовирусных препаратов против инфекции вируса Коксаки В3, особое внимание уделено разработке противовирусных препаратов прямого действия. Также упомянуты ингибиторы, нацеленные на клеточные факторы развития инфекции (включая соединения экстрактов лекарственных растений). Подробно рассмотрены следующие категории прямых ингибиторов вируса Коксаки В3: капсид-связывающие агенты (плеконарил и его производные), ингибиторы протеазы 3С (рупинтривир и его аналоги), ингибиторы репликации (как аналоги нуклеозидов, так и нуклеозидные ингибиторы). Кроме того, в обзор включены результаты исследований перепрофилирования зарегистрированных лекарственных препаратов (амилорида, бензеразида, дибукаина и флуоксетина).

Ключевые слова: энтеровирусы, коксакивирус, инфекция, миокардит, противовирусные средства, разработка лекарств, ингибитор.

Introduction

Enteroviruses are diverse group of small (30–32 nm size) icosahedral non-enveloped viruses with single-stranded non-segmented positive RNA with a poly(A) tail genome belonging to *Picornaviridae* family (International Committee on Taxonomy of Viruses). They are able to survive harsh environment and can cause both self-limiting infections, as well as polio, hand, foot and mouth disease and heart and central nervous system diseases. Currently genus *Enterovirus* encompasses 15 species: Enterovirus A-L and Rhinovirus A-C (picornavirus.com). Coxsackieviruses type B (CVB) are members of Enterovirus B species and include six serotypes (CVB1–6). CVB are lytic viruses but persistent infection responsible for chronic inflammation within target organs can be established. CVB3 often leads to mild upper respiratory and gastrointestinal illnesses, but it can also cause myocarditis. The pathogenesis of CVB3 induced myocarditis depends on both direct injury mediated by viral proteinases and indirect damage secondary to host immune responses. Myocarditis can resolve spontaneously or can progress to stable dilated cardiomyopathy (DCM). DCM patients develop heart pump weakening, heart valve problems, blood clots, and arrhythmias leading

to heart and secondary organ failures [5]. In Russian Federation CVB3 infection is also quite common among adults and children. According to the survey held in different regions in Russian Federation (2006–2015), the percentage of CVB3 in samples from patients hospitalized with enteroviral infection was rather high — 26% [1]. Despite numerous efforts, there are no direct antiviral medications approved by FDA for the treatment of enterovirus infections to date. Neither are there ongoing clinical trials in the field of CVB infection treatment or prophylaxis. Therefore, the development of novel broad-range antiviral drugs against enteroviruses including CVB3 is highly desirable.

The aim of the present review is to describe the current state of direct antiviral drug development active against Coxsackievirus type B3 infection.

CVB lifecycle

The structure of Coxsackievirus and its life cycle have been extensively studied [28]. 30 nm Coxsackievirus capsids are composed of 60 copies of biological protomers made of four capsid proteins: VP1, VP2, VP3, and VP4 arranged in icosahedral lattice. In mature virions, myristoylated VP4 and the N-terminus of VP1 are located on the

internal surface of the capsid shell. Its outer surface is characterized by depression around the icosahedral fivefold axes of symmetry (the “canyon”), and depression at the twofold axes of symmetry, which are the primary and secondary receptor-binding sites on Coxsackievirus, respectively. Underneath the “canyon”, there is a hydrophobic pocket, occupied by a pocket factor, modeled as a C16 fatty acid. Expulsion of the “pocket factor” upon virus binding to its receptor is a prelude to a series of uncoating events, leading to release of viral genome into the cytosol [7]. Coxsackievirus RNA is uncapped and contains one single open reading frame (ORF) flanked by a highly structured 5′ non-translated region (NTR) and a polyadenylated 3′NTR. A small virion protein genome-linked protein (VPg) is covalently linked to the 5′ end and a poly(A) tail at the 3′ end. 5′NTR contains sequences important for translation and replications [4]. Besides a cardiovirulent determinant has been identified in domain II of the 5′NTR [10]. VPg is used as a primer for positive-strand and negative-strand RNA synthesis. ORF is translated into a single long polypeptide containing the P1, P2 and P3 regions. The P1 region codes for capsid proteins (structural proteins) while non-structural proteins are expressed from P2 and P3 regions [14]. Though the nonstructural proteins are mainly involved in synthesizing new viral RNA, they can also interfere with cellular processes via shutting off cellular translation as well as inhibiting the induction of an immune response.

The typical infectious cycle of enteroviruses is about 5–10 h. Coxsackievirus enters a target cell upon binding the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) as the major receptor and decay accelerating factor (DAF) as a co-receptor. In polarized epithelial cells, CAR as a component of the tight junction is inaccessible to virus approaching from the apical surface. Therefore, Coxsackievirus binds to DAF on the apical cell surface, it activates Abl kinase, triggering Rac-dependent actin rearrangements that permit virus movement to the tight junction and binding to CAR [9]. On CAR-poor cells CVB3 is able to bind additional cell surface ligands, for example, CVB3 PD variant use N- and 6-O-sulfated heparan sulfates to enter CAR-negative CHO-K1 cells. In this case, the timing of cell penetration is longer, but longevity of a viral life cycle is independent of the utilized receptor [45].

After penetrating the cell, the virus is uncoated and the positive sense RNA is translated in cap independent manner. The 5′NTR contains cis-acting internal ribosome entry site (IRES) that recruits ribosomes directly to a downstream AUG codon [4]. Upon translation, the viral polyprotein is cleaved into precursors and then mature structural proteins (VP 1–4) and non-structural proteins (2A–C, 3A–D) by the virally encoded proteases 2A and 3C [14]. Both the nonstructural proteins and their precursors

(3AB, 3CD) form the membrane-associated replication complex. Although 3C protease is responsible for the majority of the newly synthesized viral polyprotein cleavage, 2A protein performs the primary cleavage event separating the structural protein precursor (P1 segment) from the nonstructural one (P2 segment). Both proteases have chymotrypsin-like structure with a cysteine nucleophile. 2A protease catalyzes the single cleavage of the viral polyprotein at a tyrosine-glycine pair between the C-terminus and N-terminus of VP1. 3C protease targets distinct glutamine-glycine residues with a preferred consensus cleavage motif of AXXQ↓GPXX (X denotes any amino acid and the arrow represents the scissile bond (peptide bond hydrolyzed by the protease) between the P1′ to P4′ and P1 to P4 amino acid residues of the substrate, respectively). In addition, active picornavirus proteases have alternative functions, including shutting off the host mRNA translation and protein synthesis and induction of apoptosis by the cleavage of host cell proteins, such as translation initiation factor G, stimulation factor 64, eIF4GI, a component of cap-binding complex eIF4F [17]. The precise regulation of these proteases, their activities, and their overlapping and unique functions remains to be fully understood.

Coxsackievirus replication takes place in the cytoplasm on the outer surface of membranous vesicles, cholesterol trafficking from cell membrane to replication organelles is thus necessary for viral propagation. Protein 2B tetramer acts as viroporine and increases the permeability of membranous structures, disturbs Ca²⁺ balance, regulates apoptosis and autophagy in host cell. It integrates into the membranes of Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum (ER), makes a pore and releases calcium from them to the cytoplasm. The disruption of calcium homeostasis leads to endoplasmic reticulum stress and production of vesicles from Golgi apparatus membrane. These vesicles are associated with virus replication complexes and display autophagosomal markers [31]. Endoplasmic reticulum stress is associated with the progression of viral myocarditis and cardiac tissue fibrosis [6]. 3A protein also targets the Golgi apparatus and inhibits anterograde trafficking, thus down-regulating distribution of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. It makes infected cells invisible for CD8⁺ T-cell immune response [8]. The role of nonstructural 2C protein in enteroviral lifecycle is complex and still not fully understood. 2C protein has RNA-binding, nucleotide binding and ATPase activities It participates in various processes including RNA binding and replication, membrane anchoring and rearrangement, encapsidation and viral morphogenesis, and suppression of nuclear factor kappa B activation. Recently, it was discovered that 2C combines functions of ATP-dependent RNA helicase (it unwinds RNA helices 3′-to-5′) and ATP-independent RNA chaperone, that destabilizes heli-

ces bidirectionally and facilitates strand annealing and complex RNA structure formation [43].

It is known, that enteroviruses 3AB precursor protein localizes the viral replication complex to the surface of membranous vesicles and acts as a cofactor to stimulate the activity of 3D polymerase (3Dpol). Genome replication of CVB3 has been described in details [11]. It is catalyzed by the viral RNA-dependent RNA polymerase in association with a number of viral and host proteins. The first step in viral replication involves the synthesis of a negative complementary strand [(-) RNA], which serves as a template for the production of positive RNA-strands [(+) RNA]. The synthesis of both RNA strands is initiated by 3B (VPg) uridylylation: the attachment of two UMP nucleotides to a tyrosine residue of VPg. VPgpUpU serves as the primer for 3Dpol to initiate synthesis of both (-) and (+) RNA strands. VPg requires a template. In the case of (+) strand synthesis, an internal stem-loop in the genomic RNA strand (cis-acting replication element, CRE) is used as a template, then VPg-pUpU is translocated to the 3' end of the complementary strand and is elongated into a full-length genomic strand. The complementary strand synthesis can be templated by CRE and the poly(A) tail of the genomic strand.

CVB3 virion morphogenesis is poorly understood, but it is known that glutathione is an essential stabilizing cofactor during the transition of protomeric particles into pentameric particles and, for example, direct binding of inhibitor TP219 to glutathione interferes with virus morphogenesis without affecting viral RNA replication [38]. 2C protein also can participate in viral RNA encapsidation, because 2C binds both RNA and virion protein VP3 [25]. After assembly, non enveloped virions are released from the cell mainly through cell lysis. Recently, it was shown, that CVB3 harnesses secretory autophagy: its virions are released from cells inside extracellular microvesicles, which hide virions from host neutralizing antibodies [33]. During the onset of infection, autophagy may help cell clear the virus, whereas later autophagy may be used for viral replication and transmission.

Current therapeutic approaches for CVB3 infection

Depending on the target, antiviral drugs can be classified into direct-acting antivirals and host factor-targeting inhibitors. Examples of host factor-targeting drugs with proved activity against CVB3 are itraconazole, umifenovir (Arbidol) [37, 35]. Various host-targeting drugs are of medicinal plant origin, for instance, α -bromo-4-chlorocinnamaldehyde (BCC), derived from cinnamaldehyde, the major component of the essential oil of cinnamon bark [46]. BCC inhibited CVB3 replication *in vitro* and reduced CVB3 induced heart damage in infected mice possibly by sup-

pression of TLR4 and/or Nf κ B activation. Oroxylin, an O-methylated flavone, isolated from aerial parts of *Scutellaria baicalensis*, demonstrated cytoprotective effect against CVB3 *in vitro* and mitigated pancreatic lesions *in vivo* in mice model of CVB3 pancreatitis. It was shown, that oroxylin increased phosphorylation of eIF2 α , which takes part in ER stress response [21]. Manassantin B (ManB), a lignan isolated from *Saururus* sp., displayed significant antiviral activity against group B coxsackieviruses *in vitro* during early steps of infection [36]. In mouse model of pancreatic CVB3 infection ManB treatment prevented body weight loss and decreased proinflammatory cytokines levels. Mechanistic studies suggested that ManB antiviral activity was associated with increased mitochondrial ROS production and activation of type I IFN signaling through cGAS/STING/TBK-1/IRF3 pathway. Unfortunately, for many tested plant extracts or derivatives the mechanisms of action were not determined or even studied. In this review, we will further focus on discovery of molecules having a defined direct viral target in CVB3 lifecycle and describe progress made in the field of direct-acting drugs development.

Direct CVB3 antivirals

Inhibitors of viral binding, internalization or uncoating

The conserved capsid structure of enteroviruses provides the basis for rational design of capsid binders with broad antiviral activity. Several molecules have been identified, that selectively inhibit the interaction of CVB with its receptor. Most capsid binders discovered execute their antiviral activity via interaction with the hydrophobic pocket at the floor of the canyon. The capsid binders stabilize the virion by pushing the bottom of the canyon upwards to prevent capsid conformational change necessary for virus uncoating. It is possible that drug integration with capsid during virion assembly additionally contributes to the antiviral activity. Capsid binders are the best studied inhibitors, but their obvious disadvantage is the rapid selection for drug-resistant strains.

In the 1980s a series of "WIN-compounds" were produced, among them WIN 63843 (pleconaril, 3-[3,5-dimethyl-4-[3-(3-methyl-1,2-oxazol-5-yl)propoxy]phenyl]-5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazole, Fig. 1) was demonstrated to have a broad activity against enteroviruses including CVB [32].

As mentioned above, one of the main disadvantages of pleconaril is the emerging of resistance. Mutation, conferring high-level resistance to pleconaril, are located in amino acid residues forming the hydrophobic pocket (I1092L or I1092M) hence directly interfering with the binding of capsid inhibitors, as well as outside the pocket (I1207K and I1207R substitutions). Originally I1092L or I1092M CVB3 variants were described to be significantly less stable than wild type virus and have attenuated viru-

lence with both reduced mortality and delayed time to death in mice, but later highly mouse-pathogenic, pleconaril-resistant I1092L or I1092M CVB3 have been isolated [13]. Unfortunately, FDA panel voted to reject pleconaril, because the panel remained unconvinced about the drug's safety profile due to the side effects of pleconaril treatment: it induced cytochrome P-450 3A (CYP 3A) enzymes, which metabolize a variety of drugs. CYP 3A induction is an undesirable drug interaction, affecting the efficacy of co-administered drugs, rather than safety. It was shown that administration of pleconaril may decrease plasma concentrations of CYP3A substrates, including some contraceptive steroids [16].

Since its discovery, various pleconaril derivatives have been designed and checked for anti-CVB3 activity. It is known, that methyl groups in capsid binder could be important for binding via hydrophobic interactions with the Ile1092 of pleconaril-sensitive CVB3, as well as they may sterically prevent capsid binders from proper positioning into the hydrophobic pocket of pleconaril-resistant CVB3 variants (Leu1092 or Met1092). A 3-bromine derivative of pleconaril (5-(trifluoromethyl)-3-[3-bromo-4-[[3-(3-methyl-5-isoxazol) propyl]-oxy]phenyl]-1,2,4-oxadiazole, Fig. 2) was obtained, that demonstrated high-level inhibition of pleconaril-sensitive CVB3 *in vitro* [34]. Importantly, the study results highlighted that both volume and lipophilicity of a compound are important determinants of anti-CVB3 activity.

Later different classes of capsid binders have been identified that demonstrated high CVB3 infection inhibition either *in vitro* or *in vivo*, and low cytotoxicity.

Among chemical library of pyrazolopyrimidines the lead compound, 4-(trifluoromethylphenyl)amino-6-phenylpyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4-amine, OBR-5-340 (Fig. 3), strongly inhibited the cytopathic effect of both pleconaril-resistant and susceptible CVB3 strains without induction of CYP3A (undesirable drug interaction) like pleconaril. Due to its favorable pharmacokinetic, toxicological and pharmacodynamics profile in mice, it was considered as highly promising drug candidate, but currently there are no information whether it will go into clinical trials [27].

Recently novel class of capsid binders having alternative binding mode were designed and tested *in vitro*. 4-dimethylamino benzoic acid (4EDMAB, Fig. 4) and its derivatives demonstrated antiviral activity against CVB1–6 [26]. It acts via a mechanism different from that of the “classical” capsid binders. Thermostability assay proved that 4EDMAB, like pleconaril, binds directly to the capsid and targets VP1, but results of molecular modeling suggested that 4EDMAB interacts with a small cavity located outside the range of the canyon and outside the hydrophobic pocket. Combinational study with pleconaril showed a synergistic antiviral effect, which further indicates a distinct mechanism of action for 4EDMAB.

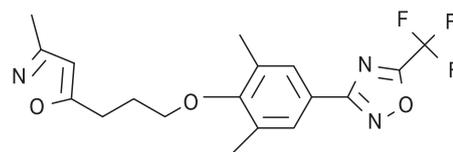


Figure 1. Pleconaril structure

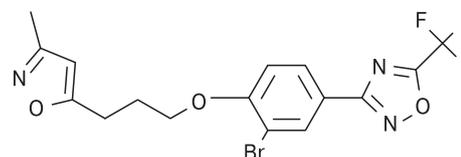


Figure 2. Potent 3 bromide pleconaril derivative

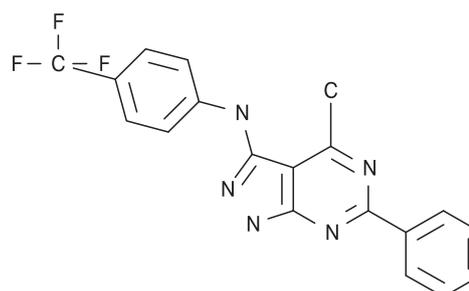


Figure 3. Structure of OBR-5-340

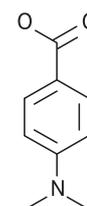


Figure 4. Structure of 4EDMAB

Lately this group of authors identified novel druggable pocket within a conserved VP1-VP3 interprotomer interface of the enteroviral capsid and developed a new inhibitor targeting this pocket. This molecule (a 4-(1,3-dioxoisindolin-2-yl) benzene-sulphonamide derivative, Fig. 5) has micromolar activity *in vitro* against a broad range of enteroviruses including CVB3 [2].

Protease inhibitors

CVB proteases are attractive targets for drug design. 3C protease is more conserved, than 2A protein, therefore most protease inhibitors targets 3C protease. Rupintrivir (also known as AG7088, Fig. 6) is the earliest direct irreversible protease inhibitor originally developed at Pfizer to inhibit human rhinovirus infection via targeting rhinovirus protease. More importantly, it also has activity against CVB3 *in vitro* [30]. As mentioned above, 3C specifically cleaves viral polyprotein at the Gln–Gly peptide bond, rupintrivir mimics the protease's recognition substrate ALFQ-X, where X is a reactive electrophilic ethyl propenoate Michael acceptor. Rupintrivir incorporates P1 lactam moieties instead of an L-glutamine residue. When

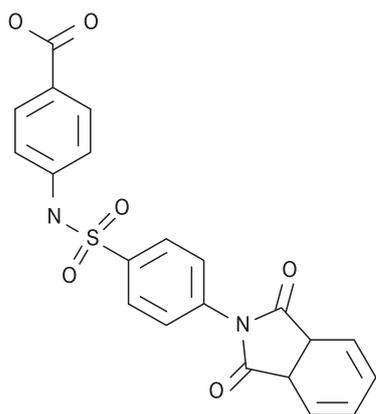


Figure 5. Structure of 4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl) benzenesulphonamide derivative

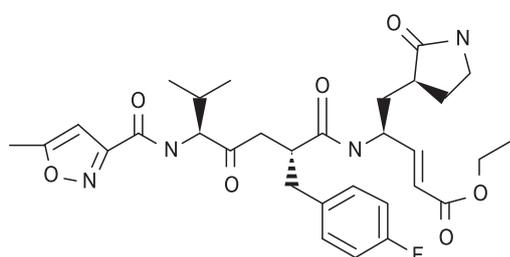


Figure 6. Rupintrivir structure

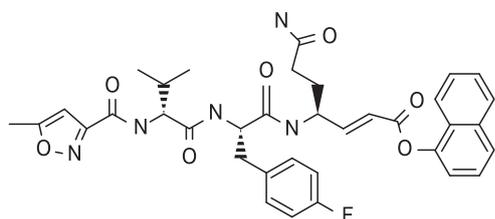


Figure 7. Structure of rupintrivir derivative 3CPI

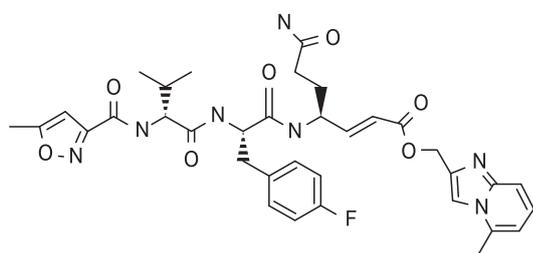


Figure 8. Structure of rupintrivir derivative LDD1588

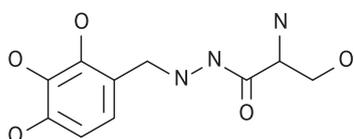


Figure 9. Structure of benzerazide

bound to the 3C protease active site, this important moiety reacts with the protease's nucleophilic Cys147-SH in the P1' active site via a Michael addition to form an S-C covalent bond, irreversibly inhibiting the protease. This peptidomimetic drug candidate reached clinical trials but was halted from further development: it failed in a study of naturally infected patients. Its ethyl moiety is rapidly hydrolyzed to yield an inactive acid form, therefore the need for multiple daily doses to achieve efficacy is the major disadvantage of rupintrivir [3].

According to the reports published, several rupintrivir analogs were designed and tested both *in vitro* and *in vivo*. In one study the most promising derivative (3CPI) showing antiviral activity against CVB3 *in vitro* was the derivative carrying a naphthalene ring (Fig. 7) [44]. This compound was water-insoluble and dissolved only in DMSO. *In vivo* studies using murine acute myocarditis model induced by CVB3-H3 strain proved that this compound possesses high antiviral activity. Upon delivery via micro-osmotic pumps implanted subcutaneously this peptidomimetic inhibited CVB3 protease activity, significantly inhibited viral proliferation, and reduced myocardial inflammations, fibrosis and mortality *in vivo*.

The drawback of insolubility of 3CPI was overcome in the next study where solubility of the compound was improved by replacement of naphthalene group with benzimidazole, which gave novel coxsackievirus 3C protease inhibitor LDD1588 (Fig. 8). Its water-soluble HCl-salt form was tested in murine chronic myocarditis model using the DBA/2 strain. Intraperitoneal administration of HCl salt form of LDD1588 for 3 days after CVB3 infection had strong antiviral effects manifested in markedly inhibited virus replication, decreased virus titers in various organs, myocardial damage and mortality [24]. Moreover, LDD1588 treatment prevented the progression from post-myocarditic remodeling to dilated cardiomyopathy.

It is worth to note, that though the electrophilic covalent binding between inhibitors (like rupintrivir and its analogues) provide irreversible inhibition, the electrophilic nature of these inhibitors increase the possibility of off-target activity against host cysteine proteases. Recently, it was described, that surprisingly benzerazide (Fig. 9), a commercial drug developed by Roche for management of Parkinson's disease, inhibits CVB3 3C protease in *in vitro* enzyme assay [18]. It appeared that benzerazide is a non-competitive protease inhibitor that interacts with a putative allosteric binding site. 2,3,4-trihydroxybenzyl moiety of benzerazide is the most important pharmacophore for enzyme's inhibitory activity.

Benzerazide was further optimized to increase anti CVB3 activity and a series of its derivatives was generated [19]. The most effective *in vitro* compound was 5-(4-hydroxyphenyl)-N'-(2,3,4-trihydroxybenzyl)pentanehydrazide (Fig. 10A). It shows activity

against CV protease in enzyme inhibition assay and then its soluble derivative with valeryl ester group at the 2,3,4-trihydroxy moiety (Fig. 10B) was potent in cell-based assay. Enzyme kinetics studies suggested that this compound is a mixed reversible inhibitor, which combines the characteristics of competitive and non-competitive inhibitors. Thus, the compound could interact with either the enzyme or the enzyme-substrate complex without substrate binding effects and could react with 3C protease to form the inactive complex.

Inhibitors of replication

Inhibitors of CVB3 polymerase can be divided into nucleoside/nucleotide inhibitors (NIs) and non-nucleoside/nucleotide inhibitors (NNIs). NI can inhibit viral replication directly via incorporation in nascent nucleic acid inducing lethal mutations and/or indirectly affecting cellular nucleotide pool. In late 1980s it was demonstrated that a widely used synthetic nucleoside ribavirin (Fig. 10), structurally related to inosine and guanosine, effectively inhibited myocardial CVB3 replication and reduced myocardial damage during the acute viral infection [20]. Unfortunately, adverse effects (in particular, hemolytic anemia) limit application of ribavirin.

A cytidine analog, gemcitabine used in cancer treatment has micromolar activity against CVB3 *in vitro*. This NI incorporates directly in nascent RNA as a nucleoside analog and potently inhibits ribonucleotide reductase enzyme. Later, it was demonstrated, that inhibition of the pyrimidine biosynthesis upon gemcitabine treatment is associated with upregulation of several IFN stimulated genes, which are the major effectors in the innate immunity [22]. 5-nitrocytidine (Fig. 11) was shown to have antiviral activity against CVB3 superior to ribavirin *in vitro*, but no results of studies on its potency *in vivo* have been reported yet though it is used *in vitro* as an inhibitor of RdRp [15].

Several N-6-substituted analogues of adenosine (JA24, JA25, Fig. 13, A, B) and guanosine (JA28, JA30, Fig. 13, C, D) greatly reduced CVB3 titer *in vitro* without being efficient substrates for cellular ribonucleotide reductase [12]. The latter suggests that they may not be converted to deoxyribonucleotides, which reduces the chance of genetic damage to replicating cellular DNA. Unfortunately, these NI have not reached animal studies since then maybe due to their cytotoxicity revealed in cell based assay.

Examples of NNI of CVB3 3Dpol with defined mechanism of action are amiloride (Fig. 14A) and GPC-N114 (Fig. 15). Amiloride (a diuretic drug) and its more potent derivative 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA, Fig. 14B) were shown to inhibit CVB3 RNA replication in cell culture [29]. They compete with incoming nucleoside triphosphates (NTPs) and Mg^{2+} . Amiloride and EIPA inhibit VPg uridylation and RNA elongation by CVB3 3Dpol

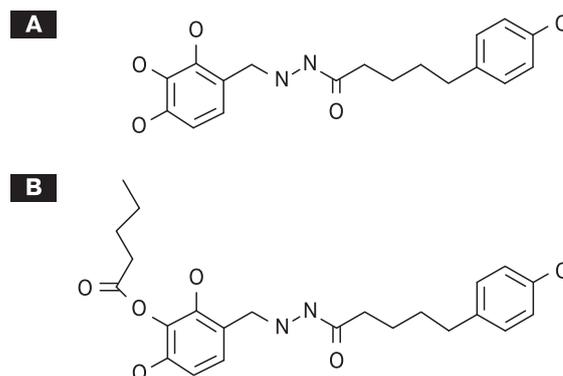


Figure 10. Structure of 5-(4-hydroxyphenyl)-N'-(2,3,4-trihydroxybenzyl)pentanehydrazide (A) and its soluble derivative (B)

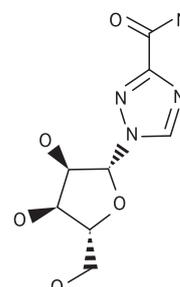


Figure 11. Structure of ribavirin

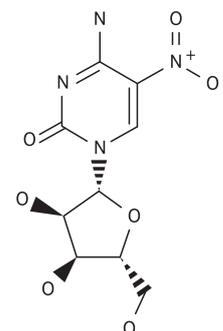


Figure 12. Structure of 5-nitro-cytidine

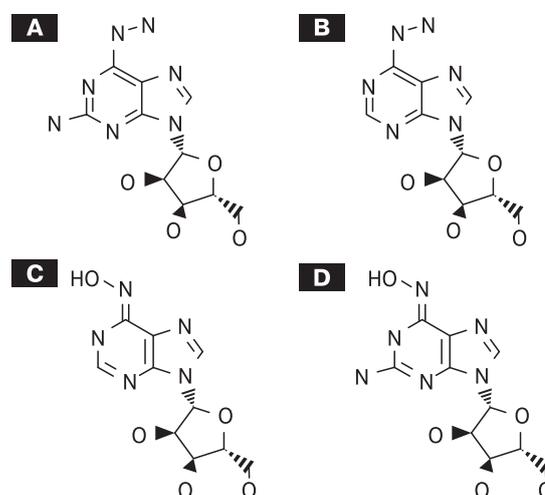


Figure 13. Structure of JA 24 (A), JA25 (B), JA28 (C) and JA30 (D)

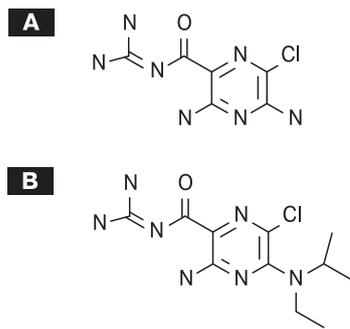


Figure 14. Amiloride (A) and EIPA (B) structures

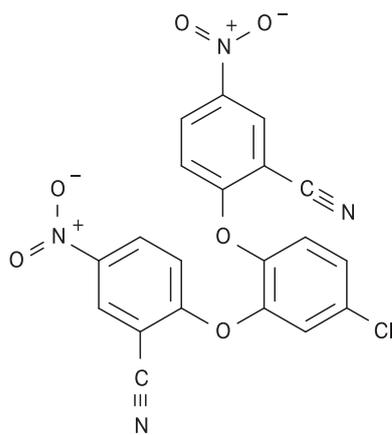


Figure 15. Structure of GPC-N114

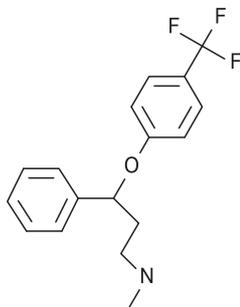


Figure 16. Structure of fluoxetine

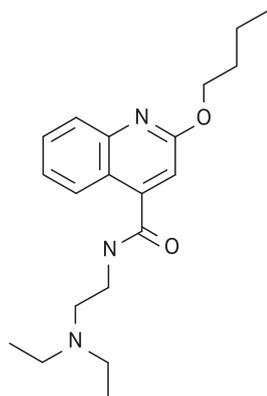


Figure 17. Structure of dibucaine

in vitro. Using molecular docking it was suggested, that a binding site for these compounds is located in 3D protein in close proximity to one of the Mg^{2+} ions and overlapping the nucleotide binding site.

GPC-N114 [(2,2'-(4-chloro-1,2-phenylene)bis(oxy)) bis(5-nitro-benzonitrile), Fig. 15] inhibited the elongation activity of recombinant CVB3 polymerase *in vitro* [41]. Results of study of crystal structure of the inhibitor bound to CVB3 3Dpol proved that GPC-N114 targets the RNA-binding channel of 3Dpol. Interestingly, CVB3 displayed a high genetic barrier to resistance against GPC-N114.

Viral 2C protein represents a very interesting target for antiviral drug design, because it has multiple functions in viral lifecycle and it is highly conserved among enteroviruses. No direct antivirals with distinct chemical structure targeting CVB3 2C protein have been reported yet. Compound KR-22865 inhibited CVB3 replication *in vitro* via targeting 2C protein and it taken in pilot animal study in murine model of chronic myocarditis induced by CVB3 infection [23]. Its application reduced virus titers and myocardial damage, maintaining mice heart function. Unfortunately, the authors hide its structural formula, and no new reports on this candidate appeared since then. Several CVB3 *in vitro* replication inhibitors have been identified from drug repurposing screening: fluoxetine, selective serotonin reuptake inhibitor, dibucaine, local anesthetic, pirlindole, reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. Results of resistance mutations study suggested that all these compounds target 2C protein. For dibucaine (Fig. 16) the direct binding with recombinant 2C protein *in vitro* was shown [39]. Fluoxetine (Fig. 17) was demonstrated to reduce 2C ATPase activity *in vitro* by 50% in the highest concentration tested [40]. So far, no 2C protein inhibitors have been tested in clinical trials.

Conclusion

Though most CVB infections can be self-limiting, it is known that CVB3 is one of the major agents for myocarditis. Possibly, the small market for anti-enteroviral drugs prevents big pharma industry from screening for enterovirus inhibitors and sponsoring expensive clinical trials. Currently the most advanced approach for anti-CVB drug design is the search for new direct antivirals and the modification of existing antiviral compounds. Drug repurposing screening is another approach for antiviral discovery. It is supposed that, in contrast to direct antivirals, drugs targeting host factors offer a higher barrier for viral resistance development of RNA viruses, because cellular targets are unlikely to attain mutations in response to therapy. Nevertheless, it was shown that after 16 weeks of selection CVB3 can develop resistance *in vitro* to a novel PI4KIII β inhibitor by acquiring substitutions in viral 3A protein [42]. It is questionable whether resistance will develop *in vivo*

upon short-term selection pressure, because often enterovirus infections are acute and of limited duration. Besides, it should be noted that targeting host cell machinery can provoke adverse effects and toxicity. Application of combinational drugs may delay or prevent the emergence of drug-resistant viruses.

Targeted antiviral drug discovery depends on basic knowledge of virus lifecycle and fundamental research on the role of viral enzymes as well as essential host factors for viral replication is necessary for the development of broad-range antiviral drugs against these important pathogens.

References

1. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Шишко Л.А., Черкасская И.В., Кириллова Л.П. Вирусы Коксаки В1–6 как этиологический фактор энтеровирусной инфекции // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 2. С. 65–71. [Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Shishko L.A., Cherkasskaya I.V., Kirillova L.P. Coxsackieviruses B1–6 as etiological factor of enterovirus infection. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 65–71. (In Russ.)]
2. Abdelnabi R., Geraets J.A., Ma Y., Mirabelli C., Flatt J.W., Domanska A., Delang L., Jochmans D., Kumar T.A., Jayaprakash V., Sinha B.N., Leyssen P., Butcher S.J., Neyts J. A novel druggable interprotomer pocket in the capsid of rhino- and enteroviruses. *PLoS Biol.*, 2019, vol. 17, no. 6: e3000281. doi: 10.1371/journal.pbio.3000281
3. Ang M.J., Lau Q.Y., Ng F.M., Then S.W., Poulsen A., Cheong Y.K., Ngho Z.X., Tan Y.W., Peng J., Keller T.H., Hill J., Chu J.J., Chia C.S. Peptidomimetic ethyl propenoate covalent inhibitors of the enterovirus 71 3C protease: a P2–P4 study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2016, vol. 31, no. 2, pp. 332–339. doi: 10.3109/14756366.2015.1018245
4. Bailey J.M., Tappich W.E. Structure of the 5' nontranslated region of the coxsackievirus b3 genome: chemical modification and comparative sequence analysis. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 2, pp. 650–668. doi: 10.1128/JVI.01327-06
5. Blyszczuk P. Myocarditis in humans and in experimental animal models. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2019, vol. 6: 64. doi: 10.3389/fcvm.2019.00064
6. Cai Z., Shen L., Ma H., Yang J., Yang D., Chen H., Wei J., Lu Q., Wang D.W., Xiang M., Wang J. Involvement of endoplasmic reticulum stress-mediated C/EBP homologous protein activation in Coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis. *Circ. Heart Fail.*, 2015, vol. 8, no. 4, pp. 809–818. doi: 10.1161/circheartfailure.114.001244
7. Chen J., Ye X., Zhang X.Y., Zhu Z., Zhang X., Xu Z., Ding Z., Zou G., Liu Q., Kong L., Jiang W., Zhu W., Cong Y., Huang Z. Coxsackievirus A10 atomic structure facilitating the discovery of a broad-spectrum inhibitor against human enteroviruses. *Cell Discov.*, 2019, vol. 5, no. 4, 15 p. doi: 10.1038/s41421-018-0073-7
8. Cornell C.T., Kioussis W.B., Harkins S., Whitton J.L. Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to down-regulate surface major histocompatibility complex class I. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 13, pp. 6785–6797. doi: 10.1128/JVI.00198-07
9. Coyne C.B., Bergelson J.M. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 1, pp. 119–131. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.035
10. Dunn J.J., Bradrick S.S., Chapman N.M., Tracy S.M., Romero J.R. The stem loop II within the 5' nontranslated region of clinical coxsackievirus B3 genomes determines cardiovirulence phenotype in a murine model. *J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 187, no. 10, pp. 1552–1561. doi: 10.1086/374877
11. Dutkiewicz M., Swiatkowska A., Ojdowska A., Smolska B., Dymarek-Babó T., Jasińska A., Ciesiołka J. Molecular mechanisms of genome expression of coxsackievirus B3 that belongs to enteroviruses. *BioTechnologia*, 2012, vol. 93, no. 4, pp. 414–423. doi: 10.5114/bta.2012.46595
12. Graci J.D., Too K., Smidansky E.D., Edathil J.P., Barr E.W., Harki D.A., Galarraga J.E., Bollinger J.M. Jr., Peterson B.R., Loakes D., Brown D.M., Cameron C.E. Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6-modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, vol. 52, no. 3, pp. 971–979. doi: 10.1128/AAC.01056-07
13. Groarke J.M., Pevear D.C. Attenuated virulence of pleconaril-resistant coxsackievirus B3 variants. *J. Infect. Dis.*, 1999, vol. 179, no. 6, pp. 1538–1541. doi: 10.1086/314758
14. Gruez A., Selisko B., Roberts M., Bricogne G., Bussetta C., Jabafi I., Coutard B., De Palma A.M., Neyts J., Canard B. The crystal structure of coxsackievirus B3 RNA-dependent RNA polymerase in complex with its protein primer VPg confirms the existence of a second VPg binding site on Picornaviridae polymerases. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 19, pp. 9577–9590. doi: 10.1128/JVI.00631-08
15. Harki D.A., Graci J.D., Galarraga J.E., Chain W.J., Cameron C.E., Peterson B.R. Synthesis and antiviral activity of 5-substituted cytidine analogues: identification of a potent inhibitor of viral RNA-dependent RNA polymerases. *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, no. 21, pp. 6166–6169. doi: 10.1021/jm060872x
16. Hayden F.G., Herrington D.T., Coats T.L., Kim K., Cooper E.C., Villano S.A., Liu S., Hudson S., Pevear D.C., Collett M., McKinlay M. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 36, no. 12, pp. 1523–1532. doi: 10.1086/375069
17. Jagdeo J.M., Dufour A., Klein T., Solis N., Kleifeld O., Kizhakkedathu J., Luo H., Overall C.M., Jan E. N-terminomics TAILS identifies host cell substrates of poliovirus and Coxsackievirus B3 3C proteinases that modulate virus infection. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 8: e02211-17. doi: 10.1128/JVI.02211-17
18. Kim B.K., Cho J.H., Jeong P., Lee Y., Lim J.J., Park K.R., Eom S.H., Kim Y.C. Benserazide, the first allosteric inhibitor of Coxsackievirus B3 3C protease. *FEBS Lett.*, 2015, vol. 589, no. 15, pp. 1795–1801. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.027
19. Kim B.K., Ko H., Jeon E.S., Ju E.S., Jeong L.S., Kim Y.C. 2,3,4-Trihydroxybenzyl-hydrazide analogues as novel potent coxsackievirus B3 3C protease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, vol. 120, pp. 202–216. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.085
20. Kishimoto C., Crumpacker C.S., Abelmann W.H. Ribavirin treatment of murine coxsackievirus B3 myocarditis with analyses of lymphocyte subsets. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1988, vol. 12, no. 5, pp. 1334–1341. doi: 10.1016/0735-1097(88)92618-6

21. Kwon B.E., Song J.H., Song H.H., Kang J.W., Hwang S.N., Rhee K.J., Shim A., Hong E.H., Kim Y.J., Jeon S.M., Chang S.Y., Kim D.E., Cho S., Ko H.J. Antiviral activity of oroxylin A against Coxsackievirus B3 alleviates virus-induced acute pancreatic damage in mice. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 5: e0155784. doi: 10.1371/journal.pone.0155784
22. Lee K., Kim D.E., Jang K.S., Kim S.J., Cho S., Kim C. Gemcitabine, a broad-spectrum antiviral drug, suppresses enterovirus infections through innate immunity induced by the inhibition of pyrimidine biosynthesis and nucleotide depletion. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 70, pp. 115315–115325. doi: 10.18632/oncotarget.23258
23. Lim B.K., Ju E.S., Lee Y.J., Jang S.A., Youn T.J., Jeon E.-S. RNA helicase (2C) inhibitor prevent enteroviral-mediated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.*, 2013, vol. 34, pp. 3502. doi: 10.1093/eurheartj/ehs309.3502
24. Lim B.K., Yun S.H., Ju E.S., Kim B.K., Lee Y.J., Yoo D.K., Kim Y.C., Jeon E.S. Soluble coxsackievirus B3 3C protease inhibitor prevents cardiomyopathy in an experimental chronic myocarditis murine model. *Virus Res.*, 2015, vol. 199, 8 p. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.030
25. Liu Y., Wang C., Mueller S., Paul A.V., Wimmer E., Jiang P. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog.*, 2010, vol. 6, no. 8: e1001066. doi: 10.1371/journal.ppat.1001066
26. Ma Y., Abdelnabi R., Delang L., Froeyen M., Luyten W., Neyts J., Mirabelli C. New class of early-stage enterovirus inhibitors with a novel mechanism of action. *Antiviral Res.*, 2017, vol. 147, pp. 67–74. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.10.004
27. Makarov V.A., Braun H., Richter M., Riabova O.B., Kirchmair J., Kazakova E.S., Seidel N., Wutzler P., Schmidtke M. Pyrazolopyrimidines: potent inhibitors targeting the capsid of Rhino- and Enteroviruses. *Chem. Med. Chem.*, 2015, vol. 10, no. 10, pp. 1629–1634. doi: 10.1002/cmdc.201500304
28. Muckelbauer J.K., Kremer M., Minor I., Diana G., Dutko F.J., Groarke J., Pevear D.C., Rossmann M.G. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure*, 1995, vol. 3, no. 7, pp. 653–667. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00201-5
29. Ogram S.A., Boone C.D., McKenna R., Flanagan J.B. Amiloride inhibits the initiation of coxsackievirus and poliovirus RNA replication by inhibiting VPg uridylylation. *Virology*, 2014, vol. 464–465, pp. 87–97. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.025
30. Patick A.K., Binford S.L., Brothers M.A., Jackson R.L., Ford C.E., Diem M.D., Maldonado F., Dragovich P.S., Zhou R., Prins T.J., Fuhrman S.A., Meador J.W., Zalman L.S., Matthews D.A., Worland S.T. In vitro antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 10, pp. 2444–2450. doi: 10.1128/AAC.43.10.2444
31. Peischarde S., Ho H.T., Theiss C., Strutz-Seebohm N., Seebohm G. A kidnapping story: how coxsackievirus B3 and its host cell interact. *Cell Physiol. Biochem.*, 2019, vol. 53, no. 1, pp. 121–140. doi: 10.33594/000000125
32. Pevear D.C., Tull T.M., Seipel M.E., Groarke J.M. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 9, pp. 2109–2115. doi: 10.1128/AAC.43.9.2109
33. Robinson S.M., Tsueng G., Sin J., Mangale V., Rahawi S., McIntyre L.L., Williams W., Kha N., Cruz C., Hancock B.M., Nguyen D.P., Sayen M.R., Hilton B.J., Doran K.S., Segall A.M., Wolkowicz R., Cornell C.T., Whitton J.L., Gottlieb R.A., Feuer R. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 4: e1004045. doi: 10.1371/journal.ppat.1004045
34. Schmidtke M., Wutzler P., Zieger R., Riabova O.B., Makarov V.A. New pleconaril and [(biphenyloxy)propyl]isoxazole derivatives with substitutions in the central ring exhibit antiviral activity against pleconaril-resistant coxsackievirus B3. *Antiviral Res.*, 2009, vol. 81, no. 1, pp. 56–63. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.09.002
35. Shi L., Xiong H., He J., Deng H., Li Q., Zhong Q., Hou W., Cheng L., Xiao H., Yang Z. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackievirus and adenovirus in vitro and in vivo. *Arch. Virol.*, 2007, vol. 152, no. 8, pp. 1447–1455. doi: 10.1007/s00705-007-0974-5
36. Song J.H., Ahn J.H., Kim S.R., Cho S., Hong E.H., Kwon B.E., Kim D.E., Choi M., Choi H.J., Cha Y., Chang S.Y., Ko H.J. Manassantin B shows antiviral activity against coxsackievirus B3 infection by activation of the STING/TBK-1/IRF3 signalling pathway. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1: 9413. doi: 10.1038/s41598-019-45868-8
37. Strating J.R., van der Linden L., Albulescu L., Bigay J., Arita M., Delang L., Leyssen P., van der Schaar H.M., Lanke K.H., Thibaut H.J., Ulferts R., Drin G., Schlinck N., Wubbolts R.W., Sever N., Head S.A., Liu J.O., Beachy P.A., De Matteis M.A., Shair M.D., Olkkonen V.M., Neyts J., van Kuppeveld F.J. Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Rep.*, 2015, vol. 10, no. 4, pp. 600–615. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.054
38. Thibaut H.J., van der Linden L., Jiang P., Thys B., Canela M.D., Aguado L., Rombaut B., Wimmer E., Paul A., Pérez-Pérez M.J., van Kuppeveld F., Neyts J. Binding of glutathione to enterovirus capsids is essential for virion morphogenesis. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 4: e1004039. doi: 10.1371/journal.ppat.1004039
39. Ulferts R., de Boer S.M., van der Linden L., Bauer L., Lyoo H.R., Maté M.J., Lichière J., Canard B., Lelieveld D., Omta W., Egan D., Coutard B., van Kuppeveld F.J. Screening of a library of FDA-approved drugs identifies several enterovirus replication inhibitors that target viral protein 2C. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 5, pp. 2627–2638. doi: 10.1128/AAC.02182-15
40. Ulferts R., van der Linden L., Thibaut H.J., Lanke K.H., Leyssen P., Coutard B., De Palma A.M., Canard B., Neyts J., van Kuppeveld F.J. Selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine inhibits replication of Human enteroviruses B and D by targeting viral protein 2C. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 4, pp. 1952–1956. doi: 10.1128/AAC.02084-12
41. Van der Linden L., Vives-Adrián L., Selisko B., Ferrer-Orta C., Liu X., Lanke K., Ulferts R., De Palma A.M., Tanchis F., Goris N., Lefebvre D., De Clercq K., Leyssen P., Lacroix C., Pürstinger G., Coutard B., Canard B., Boehr D.D., Arnold J.J., Cameron C.E., Verdager N., Neyts J., van Kuppeveld F.J. The RNA template channel of the RNA-dependent RNA polymerase as a target for development of antiviral therapy of multiple genera within a virus family. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 3: e1004733. doi: 10.1371/journal.ppat.1004733
42. Van der Schaar H.M., Leyssen P., Thibaut H.J., de Palma A., van der Linden L., Lanke K.H., Lacroix C., Verbeke E., Conrath K., Macleod A.M., Mitchell D.R., Palmer N.J., van de Poël H., Andrews M., Neyts J., van Kuppeveld F.J. A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host cell factor phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 10, pp. 4971–4981. doi: 10.1128/AAC.01175-13

43. Xia H., Wang P., Wang G.C., Yang J., Sun X., Wu W., Qiu Y., Shu T., Zhao X., Yin L., Qin C.F., Hu Y., Zhou X. Human enterovirus nonstructural protein 2C ATPase functions as both an RNA helicase and ATP-independent RNA chaperone. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 7: e1005067. doi: 10.1371/journal.ppat.1005067
44. Yun S.H., Lee W.G., Kim Y.C., Ju E.S., Lim B.K., Choi J.O., Kim D.K., Jeon E.S. Antiviral activity of coxsackievirus B3 3C protease inhibitor in experimental murine myocarditis. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 205, no. 3, pp. 491–497. doi: 10.1093/infdis/jir745
45. Zautner A.E., Jahn B., Hammerschmidt E., Wutzler P., Schmidtke M. N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 13, pp. 6629–6636. doi: 10.1128/JVI.01988-05
46. Zhang Y., Cao W., Xie Y.H., Yang Q., Li X.Q., Liu X.X., Wang S.W. The comparison of α -bromo-4-chlorocinnamaldehyde and cinnamaldehyde on coxsackie virus B3-induced myocarditis and their mechanisms. *Int. Immunopharmacol.*, 2012, vol. 14, no. 1, pp. 107–113. doi: 10.1016/j.intimp.2012.06.007

Авторы:

Волобуева А.А., научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Зарубаев В.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Ланцева К.С., студент, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Volobueva A.S., Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zarubaev V.V., PhD MD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Lantseva K.S., Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.09.2019
Отправлена на доработку 20.11.2019
Принята к печати 11.03.2020

Received 19.09.2019
Revision received 20.11.2019
Accepted 11.03.2020

ИНФЕКЦИЯ *HELICOBACTER PYLORI* И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КИШЕЧНИКА

Ю.П. Успенский^{1,2}, Н.В. Барышникова^{2,4}, А.Н. Суворов^{3,4}, А.В. Сварваль⁵

¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В кишечнике человека *Helicobacter pylori* выявляется в среднем в 35% случаев, однако вопрос об этиопатогенетической роли бактерии в возникновении болезней этого отдела пищеварительной трубки до конца не изучен. Предпринимаются попытки установить взаимосвязь между персистенцией *H. pylori* и развитием различных заболеваний кишечника. Говоря о возможной связи *H. pylori* и воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), ученые высказывают разные точки зрения. В обзорной статье представлены результаты российских и зарубежных исследований, посвященных изучению предполагаемой роли *H. pylori* как триггера, так и протектора в формировании патогенетических нарушений, приводящих к развитию болезни Крона и язвенного колита. В пользу гипотезы о триггерной роли *H. pylori* в развитии ВЗК говорит наличие возможной связи внежелудочных проявлений инфекции с прямым повреждающим действием микроорганизма и косвенными эффектами возбудителя, способствующими запуску окислительного стресса, аутоиммунной агрессии и развитию дисбиоза кишечника. Также обсуждаются вопросы влияния персистенции энтерогепатических *Helicobacter* spp. как промоуторов в запуске патогенеза ВЗК. Механизмами, лежащими в основе защитной роли инфекции *H. pylori*, могут быть дифференциальная экспрессия острого и/или хронического местного воспалительного ответа слизистой оболочки, который может снизить системные иммунные ответы и подавить аутоиммунные реакции, а также изменение иммунологического ответа хозяина от провоспалительного Th1/Th17-ответа к повышенному Т-регуляторному клеточному иммунному ответу. Кроме того, *H. pylori* может индуцировать продукцию антибактериальных пептидов, которые противодействуют потенциально патогенным бактериям, вовлеченным в патогенез ВЗК. Установлено, что у пациентов с ВЗК преобладает умеренно выраженный активный антральный гастрит с явлениями атрофии, наибольшая степень выраженности которой наблюдается у пациентов в возрасте до 30 лет. Степень выраженности кишечной метаплазии слизистой оболочки желудка у пациентов с ВЗК зависит от длительности клинического течения заболевания. Базисная терапия ВЗК препаратами 5-аминосалициловой кислоты снижает выраженность и активность гастрита, степень выраженности атрофии, степень инвазии слизистой оболочки желудка *H. pylori*. Есть данные, что препараты 5-аминосалициловой кислоты могут привести к так называемой «спонтанной эрадикации» хеликобактерной инфекции. Необходимы дальнейшие расширенные исследования по изучению роли *H. pylori* и его эрадикации в патогенезе ВЗК.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, язвенный колит, болезнь Крона, персистенция, иммунный ответ, триггер.

Адрес для переписки:

Сварваль Алена Владимировна
197348, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (911) 223-14-11 (моб.).
E-mail: alenasvar@rambler.ru

Contacts:

Alena V. Svarval
197348, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (911) 223-14-11 (mobile).
E-mail: alenasvar@rambler.ru

Для цитирования:

Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Суворов А.Н., Сварваль А.В.
Инфекция *Helicobacter pylori* и воспалительные заболевания
кишечника // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 68–78.
doi: 10.15789/2220-7619-HPI-1510

Citation:

Uspenskiy Yu.P., Baryshnikova N.V., Suvorov A.N., Svarval A.V. *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 68–78. doi: 10.15789/2220-7619-HPI-1510

HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASESUspenskiy Yu.P.^{a,b}, Baryshnikova N.V.^{b,d}, Suvorov A.N.^{c,d}, Svarval A.V.^e^a St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^b Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation^d Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation^e St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Helicobacter pylori* is detected in the human intestine on average in 35% of clinical cases, but the question about its etiopathogenetic role in intestinal diseases has not been fully investigated. Many scientists study a relationship between the *H. pylori* persistence and development of various bowel diseases. Diverse viewpoints have been proposed regarding a potential link between *H. pylori* and inflammatory bowel diseases (IBD). Here we review the data from domestic and foreign studies aimed at examining potential role of *H. pylori* both as a trigger and protector resulting in the pathogenetic alterations leading to developing Crohn's disease and ulcerative colitis. The former is favored by the hypothesis wherein *H. pylori* may trigger IBD due to potential connection between extragastric infection and its direct damaging action as well as indirect effects contributing to the initiation of oxidative stress, autoimmune aggression and development of intestinal dysbiosis. In addition, the effects of enterohepatic *Helicobacter* spp. promoting IBD pathogenesis are discussed. The mechanisms underlying the protective role of *H. pylori* infection may be driven via differentially expressed acute and/or chronic local inflammatory mucosal response able to downmodulate systemic immune responses and suppress autoimmune reactions, as well as skewing host immune response from a pro-inflammatory Th1/Th17 cell-mediated towards regulatory T-cell response. Moreover, it was found that *H. pylori* may induce production of antibacterial peptides counteracting potentially pathogenic bacteria involved in IBD pathogenesis. In particular, it was found that IBD patients are dominated with moderate active antral gastritis coupled to atrophy, with the peak intensity observed in patients under 30 years of age. Intensity of intestinal metaplasia in the gastric mucosa of IBD patients accounted for by the duration of the disease course. Basal IBD therapy with 5-aminosalicylic acid lowers severity and activity of gastritis, degree of atrophy as well as magnitude *H. pylori* invasion in the gastric mucosa. There is evidence that 5-aminosalicylic acid-containing drugs may result in a so-called "spontaneous eradication" of *H. pylori* infection. Extended investigations are required to examine a role of *H. pylori* in IBD pathogenesis.

Key words: *Helicobacter pylori*, ulcerative colitis, Crohn's disease, persistence, immune response, trigger.

Введение

В кишечнике человека *H. pylori* выявляется в среднем в 35% случаев, однако вопрос об этиопатогенетической роли бактерии в возникновении болезней этого отдела пищеварительной трубки до конца не изучен. Предпринимаются попытки установить взаимосвязь между персистенцией *H. pylori* и развитием различных заболеваний кишечника. Говоря о возможной связи *H. pylori* и ВЗК, ученые высказывают три разные точки зрения:

1. *H. pylori* не играет какой-либо этиологической роли в развитии ВЗК [24];
2. персистенция инфекции *H. pylori* может играть определенную роль в патогенезе ВЗК из-за сходных иммунологических механизмов патогенеза этих заболеваний [48, 49];
3. наблюдается более низкая частота встречаемости *H. pylori* у больных ВЗК, чем в популяции, а также отмечается своеобразная протективная роль *H. pylori* в развитии язвенного колита (ЯК) и болезни Крона (БК); данная гипотеза имеет наибольшее число последователей [27, 49, 62].

***H. pylori* — триггерный фактор в развитии ВЗК**

В пользу гипотезы о триггерной роли *H. pylori* в развитии ВЗК говорит наличие возможной связи внежелудочных проявлений инфекции

с прямым повреждающим действием микроорганизма и косвенными эффектами возбудителя. Прямое повреждающее действие микроорганизма обусловлено выработкой уреазы и цитотоксинов, которые могут оказывать негативный эффект на слизистую подвздошной и толстой кишки, в частности, в виде стимуляции локального воспаления в стенках сосудов [66]. К повреждающим эффектам бактерии можно отнести и индукцию повышенной агрегации тромбоцитов, что приводит к образованию микротромбов в слизистой оболочке желудка и кишечника и способствует развитию язвенного поражения слизистой оболочки пищеварительной трубки [14]. Также *H. pylori* влияет на иммунный ответ макроорганизма посредством активации лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой (MALT), что может привести к более генерализованному иммунному ответу на инфекцию *H. pylori* при ВЗК, способствуя иницированию или сохранению воспаления. Это подтверждается рядом работ, в которых показано, что число активированных Т-клеток, ассоциированных с персистенцией *H. pylori*, увеличивается в воспаленной слизистой оболочке кишечника у пациентов с ВЗК [13]. Кроме того, местные воспалительно-деструктивные изменения слизистой оболочки гастродуоденальной зоны, развивающиеся на фоне персистенции бактерии, могут оказывать системные эффекты, например способствовать активации системного воспалительного процесса с продукцией цитокинов, эйкозаноидов и других

медиаторов. Микроорганизм взаимодействует с тучными клетками с последующей секрецией биологически активных веществ, действующих на сосуды, бронхи и другие внутренние органы, а также с развитием аллергических реакций преимущественно немедленного типа. Длительная персистенция микроба приводит к снижению барьерной функции кишечника, что вызывает поступление токсических продуктов, аллергенов в кровь. Также при инфицировании *H. pylori* происходит «обкрадывание» макроорганизма, так как бактерия поглощает ряд макро- и микро-элементов, в частности железа, для процессов своей жизнедеятельности. Косвенные эффекты возбудителя связаны со стимуляцией факторов неспецифической и специфической иммунологической защиты, которые сами способны вызывать повреждение вдалеке от основного очага инфекции, например активировать окислительный стресс. Воспалительный ответ слизистой оболочки на инвазию *H. pylori* наиболее похож на комбинированный клеточный иммунный ответ с высокой продукцией IL-12, что приводит к Т-хелперному ответу первого типа и повышению уровня Th1-цитокинов [12, 44, 67]. Продукты местной иммунной реакции могут перемещаться экстрагастрально, что объясняет связь между инфицированием *H. pylori* и развитием внежелудочных заболеваний, в том числе аутоиммунных [50, 60, 79].

Другим важным механизмом воздействия *H. pylori* на организм человека и вызывающих развитие внежелудочных, в особенности аутоиммунных, нарушений является феномен молекулярной (антигенной) мимикрии. Этот феномен относится к механизмам вирулентности микроорганизма и представляет собой способность ряда микробов «копировать» антигенную структуру (белки) макроорганизма. В подобных случаях антитела, вырабатываемые против бактериального антигена, имитирующего какой-либо белок человека, могут атаковать и клетки макроорганизма (аутоагрессия), что способствует усилению иммунного ответа и повреждению тканей и органов человека с развитием различных заболеваний. Под воздействием микроорганизма нарушается поверхностная структура слизистой оболочки, что приводит к модификации либо «обнажению» собственных антигенов макроорганизма с последующим развитием аутоиммунных (иммунопатологических) реакций. Антитела против некоторых белков-антигенов микроорганизма могут вызывать перекрестные аутоиммунные реакции с белками различных тканей и органов организма человека. Предполагается, что имеет значение непосредственное воздействие микроорганизма через активацию воспалительного процесса наряду с высвобождением цитокинов и медиаторов воспаления с последующими системными эффектами, что особенно актуально у предрас-

положенных лиц. В конечном итоге, как и при проникновении в организм любого чужеродного агента, обладающего антигенными свойствами, так и при инфицировании *H. pylori*, происходит сенсибилизация организма. При этом в тканях и органах происходят структурные изменения по типу реакций гиперчувствительности немедленного или замедленного типа [3].

Кроме того, длительно существующее хроническое воспаление запускает каскад патологических реакций, приводящих к системным изменениям в организме человека, что, прежде всего, отражается на состоянии микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Развитие же дисбиоза пищеварительной трубки, в первую очередь дисбиоза кишечника, является также триггерным фактором в развитии ВЗК за счет изменения выработки бактериальных метаболитов и нейротрансмиттеров.

Есть мнение, что, возможно, имеет место транслокация *H. pylori* из желудка в толстую кишку с последующим развитием воспалительных изменений именно в кишке. *H. pylori* обычно находится в слизистой оболочке желудка, но ДНК *H. pylori* также определяется в толстой кишке [31] и в стуле инфицированных пациентов [29, 30, 32]. Так, при обследовании 30 пациентов с впервые установленным диагнозом ЯК и 30 лиц группы контроля в плацебо-контролируемом исследовании наличие *H. pylori* оценивалось гистологически (окраска по Романовскому—Гимзе) и иммуногистохимически в биоптатах толстой кишки, а также с помощью определения антигена *H. pylori* в кале. В результате было установлено, что у 12 из 30 пациентов с ЯК (40%) выявлено инфицирование *H. pylori* гистологически и у 17 из 30 (56,6%) иммуногистохимическим методом. В контрольной группе данные показатели составили 4 из 30 (13,3%) и 6 из 30 (20%) соответственно. Следовательно, частота встречаемости *H. pylori* в биоптатах толстой кишки у пациентов с ЯК достоверно выше, чем у лиц в группе контроля ($p = 0,04$ и $0,007$). Примечательно, что у четырех *H. pylori*-позитивных пациентов из группы контроля микроскопически определялись признаки начинающегося ЯК [40]. *H. pylori* был обнаружен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в слизистой оболочке толстой кишки у больных ЯК и БК с поражением толстой кишки [47, 48, 73]. В другом исследовании показано, что *H. pylori* обнаруживается в фекалиях большинства детей с БК [39].

Однако более часто в литературе встречается указание на то, что не *H. pylori*, а энтерогепатические *Helicobacter* spp. (ЭГХ), которые преимущественно колонизируют кишечник и гепатобилиарную систему, связаны с развитием хронических заболеваний печени и кишечника [69]. Показано, что присутствие других бактерий *Helicobacter* spp. (P-OR: 2,62, p value = 0,001) и *Campylobacter* spp., в особенности *C. concisus*

(P-OR: 3,76, p value = 0,006) и *C. showae* (P-OR: 2,39, p value = 0,027), было связано с повышенным риском развития ВЗК [9].

На моделях животных показано, что энтеро-гепатические *Helicobacter* spp., например *H. hepaticus* и *H. bilis*, могут индуцировать персистирующее воспаление в толстой кишке и слепой кишке у грызунов с иммунодефицитом [34, 65]. *H. hepaticus* является триггером развития колита у мышей с дефицитом IL-10 посредством механизма, зависящего от IL-12 и IFN γ [34]. Присутствие *H. muridarum* повышает активность заболевания и воспаления в моделях острого колита [45] и потенцирует воспаление, подобное болезни Крона, у мышей с иммунодефицитом посредством влияния на Т-клетки [26]. Накапливаются доказательства, что у грызунов присутствие ЭГХ ухудшает тяжесть или ускоряет развитие колита [25, 85].

Данные исследований с включением приматов и человека более противоречивы. Некоторые штаммы ЭГХ определяются в толстой кишке пациентов с энтеритом и/или проктитом [22]. Персистенция *H. macacae* связана с развитием хронического идиопатического колита у молодых макак-резусов [17]. Выявление *H. pullorum* или *H. canadensis* достоверно связано с развитием болезни Крона у взрослых [35]. *Helicobacter* spp. были обнаружены либо в образцах кала [39], либо в биоптатах толстой кишки [86] у детей с болезнью Крона, и распространенность *Helicobacteraceae* была значительно выше у данной категории пациентов (32/77, 41,5%) по сравнению с группой контроля (23/102, 22,5%) [28]. *H. fennelliae* и *H. pullorum* были обнаружены в биоптатах толстой кишки у 12% пациентов с болезнью Крона [7]. Частота встречаемости *H. genus*, определенная методом ПЦР, была достоверно выше у пациентов с ЯК по сравнению с группой контроля (32/77 против 11/59, p = 0,004) [76]. С другой стороны, есть исследования, в которых *Helicobacter* spp. не определяются в биоптатах толстой кишки пациентов с ВЗК [5, 6, 19, 24, 74]. Кроме того, в работе китайских ученых показано, что нет достоверных различий в частоте встречаемости *Helicobacter* spp. в биоптатах толстой кишки у 160 больных ВЗК (10%) и 80 лиц группы контроля (6,3%) [87]. В более раннем исследовании показано, что инфекция *H. pylori* была выявлена только у 2 из 41 ребенка с БК (4,8%) и у 5 из 47 больных ЯК (10,6%) [63].

H. pylori — протективный фактор в развитии ВЗК

Большинство исследователей поддерживают гипотезу о более низкой частоте встречаемости *H. pylori* у больных ВЗК, чем в популяции и о протективной роли бактерии в развитии данной категории заболеваний (табл. 1). Только небольшое число исследований демонстрирует отсутствие различий в инфицированности данным микро-

организмом больных ВЗК и пациентов без ВЗК или более высокие показатели частоты встречаемости *H. pylori* у больных ВЗК [46, 47, 52, 55, 80].

Интересен метаанализ, в котором изучалась ассоциация между персистенцией *H. pylori* и развитием ВЗК. В результате было установлено, что у пациентов с БК, ЯК и неклассифицируемым колитом (НКК) имеет место отрицательная корреляционная связь между персистенцией *H. pylori* в желудке и ВЗК (P-OR: 0,43, p value < 1e-10). Эта ассоциация была более сильной у пациентов с БК (P-OR: 0,38, p value < 1e-10) и НКК (P-OR: 0,43, p value = 0,008), чем у пациентов с ЯК (P-OR: 0,53, p value < 1e-10) [9].

Метаанализ 23 исследований показал возможную протективную роль *H. pylori* в патогенезе БК, но неоднородность зарегистрированных исследований и возможность предвзятости публикаций ограничивали достоверность этих результатов [38].

В другом исследовании при выполнении эндоскопии верхних отделов желудочно-кишечного тракта 49 пациентам с ЯК проводилось взятие биоптатов для гистологического исследования на наличие инфекции *H. pylori*. Микроорганизм был выявлен у 57,1% пациентов, при этом у пациентов с панколитом частота встречаемости *H. pylori* была ниже (11,1%), чем у больных, имеющих проявления левостороннего колита или проктита. Связи между распространенностью *H. pylori*, тяжестью течения заболевания и видом принимаемых лекарственных препаратов выявлено не было [8].

Протективная роль *H. pylori* в отношении развития аутоиммунных заболеваний [60] описана для бронхиальной астмы [61] и сахарного диабета 1 типа [33]. Механизмами, лежащими в основе защитной роли инфекции *H. pylori*, являются дифференциальная экспрессия острого и/или хронического местного воспалительного ответа слизистой оболочки, который может вызвать системное высвобождение цитокинов [56], которые, в свою очередь, могут снизить системные иммунные ответы и подавить аутоиммунные реакции. Возможным механизмом потенциальной защитной роли *H. pylori* против развития ВЗК может быть изменение иммунологического ответа хозяина от провоспалительного Th1/Th17-ответа к повышенному Т-регуляторному клеточному иммунному ответу [37, 59]. Кроме того, *H. pylori* способен индуцировать продукцию антибактериальных пептидов, которые противодействуют потенциально патогенным бактериям, вовлеченным в патогенез ВЗК [83].

Эрадикация *H. pylori* и ВЗК

Установлено, что в эндемических районах с высокой распространенностью *H. pylori* наблюдается устойчивый рост заболеваемости ВЗК после широкого применения антихеликобактерной

терапии [75]. Есть работы, которые показывают, что после проведения эрадикационной терапии через 6–12 месяцев возрастает риск развития ВЗК [10], но работы других авторов опровергают

эту гипотезу [62]. Есть исследования, показывающие, что проведение эрадикации у *H. pylori*-позитивных больных ЯК не ухудшает течение основного заболевания [64].

Таблица 1. Частота встречаемости *H. pylori* у больных ВЗК [цит. по 49 с измен.]

Table 1. Prevalence of *H. pylori* in IBD patients [cit. 49 with changes]

БК, n CD, n	ЯК, n UC, n	Группа контроля (К), n Control group	Группа контроля, диагнозы Control group, diagnosis(es)	Метод верификации <i>H. pylori</i> <i>H. pylori</i> verification method	<i>H. pylori</i> (+) пациенты, % <i>H. pylori</i> (+) patients, %	Ссылка Reference
42	51	40	Синдром раздраженной кишки (СРК) Irritable bowel syndrome (IBS)	Уреазный дыхательный тест (УДТ), <i>H. pylori</i> IgG (+) Urease breath test (UDT), <i>H. pylori</i> IgG (+)	ВЗК: 17.2 (БК 11.9, ЯК: 21.6, К: 25) IBD: 17.2 (CD: 11.9, UC: 21.6, C: 25)	[54]
139	137	139	Функциональные кишечные расстройства Functional intestinal disorders	<i>H. pylori</i> IgG (+)	ВЗК: 9.4 (БК: 5, ЯК: 14, К: 16) IBD: 9.4 (CD: 5, UC: 14, C: 16)	[16]*
47	63	100	Доноры крови Blood donors	<i>H. pylori</i> IgG (+), УДТ, гистология <i>H. pylori</i> IgG (+), UDT, histology	ВЗК: 21.8 (БК: 14.9, ЯК: 27, К: 52) IBD: 21.8 (CD: 14.9, UC: 27, C: 52)	[15]*
67	41	43	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Биопсия Biopsy	ВЗК: 28.7 (БК: 28.4, ЯК: 29.3, К: 39.5) IBD: 28.7 (CD: 28.4, UC: 29.3, C: 39.5)	[11]*
123	93	216	Доноры крови Blood donors	<i>H. pylori</i> IgG (+), гистология <i>H. pylori</i> IgG (+), histology	ВЗК: 48.1 (БК: 40.7, ЯК: 55.9, К: 58.8) IBD: 48.1 (CD: 40.7, UC: 55.9, C: 58.8)	[51]*
32	40	72	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	УДТ UDT	ВЗК: 47.2 (БК: 53.1, ЯК: 42.5, К: 61.1) IBD: 47.2 (CD: 53.1, UC: 42.5, C: 61.1)	[57]
0	90	120	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Гистология, быстрый уреазный тест (БУТ) Histology, rapid urease test (RUT)	ВЗК: 30 (БК: НД, ЯК: 30, К: 52.5) IBD: 30 (CD: ND, UC: 30, C: 52.5)	[41]*
39	77	127	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	<i>H. pylori</i> IgG (+)	ВЗК: 31.7 (БК: 28.6, ЯК: 33.1, К: 55.1) IBD: 31.7 (CD: 28.6, UC: 33.1, C: 55.1)	[77]*
94	185	70	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	<i>H. pylori</i> IgG, IgA (+)	ВЗК: 24.4 (БК: 12.9, ЯК: 29.7, К: 37.1) IBD: 24.4 (CD: 12.9, UC: 29.7, C: 37.1)	[81]*
100	100	100	Острая бактериальная диарея Acute bacterial diarrhea	<i>H. pylori</i> IgG, IgA (+)	ВЗК: 15 (БК: 13, ЯК: 18, К: 43) IBD: 15, (CD: 13, UC: 18, C: 43)	[21]*
147	169	316	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	УДТ UDT	ВЗК: 25.3 (БК: 17.7, ЯК: 32, К: 52.1) IBD: 25.3 (CD: 17.7, UC: 32, C: 52.1)	[68]*
386	0	277	Доноры крови Blood donors	<i>H. pylori</i> IgG, IgA (+)	ВЗК: 17.4 (БК: 17.4, ЯК: НД, К: 35.4) IBD: 17.4 (CD: 17.4, UC: ND, C: 35.4)	[82]*
90	0	525	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Гистология Histology	ВЗК: 16.7 (БК: 16.7, ЯК: НД, К: 40.2) IBD: 16.7 (CD: 16.7, UC: ND, C: 40.2)	[42]*
38	0	12	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	УДТ UDT	ВЗК: 8 (БК: 8, ЯК: НД, К: 42) IBD: 8 (CD: 8, UC: ND, C: 42)	[4]*
80	39	98	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	<i>H. pylori</i> IgG (+)	ВЗК: 27.5 (БК: 13.5, ЯК: 30.8, К: 41.7) IBD: 27.5 (CD: 13.5, UC: 30.8, C: 41.7)	[36]*
51	82	200	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	УДТ UDT	ВЗК: 12.8 (БК: 13.7, ЯК: 12.2, К: 39) IBD: 12.8 (CD: 13.7, UC: 12.2, C: 39)	[58]*

БК, n CD, n	ЯК, n UC, n	Группа контроля (К), n Control group	Группа контроля, диагноз(ы) Control group, diagnosis(es)	Метод верификации <i>H. pylori</i> <i>H. pylori</i> verification method	<i>H. pylori</i> (+) пациенты, % <i>H. pylori</i> (+) patients, %	Ссылка Reference
36	0	36	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Гистология Histology	ВЗК: 8.3 (БК: 8.3, UC: НД, К: 36.1) IBD: 8.3 (CD: 8.3, UC: НД, C: 36.1)	[43]*
56	0	382	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Гистология Histology	ВЗК: 32.1 (БК: 32.1, ЯК: НД, К: 46.1) IBD: 32.1 (CD: 32.1, UC: НД, C: 46.1)	[53]
371	560	64 451	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Гистология Histology	ВЗК: 4.5 (БК: 4, ЯК: 5, К: 9) IBD: 4.5 (CD: 4, UC: 5, C: 9)	[70]*
43	0	74	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	УДТ UDT	ВЗК: 51.2 (БК: 51.2, ЯК: НД, К: 70.3) IBD: 51.2 (CD: 51.2, UC: ND, C: 70.3)	[48]
50	44	194	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Гистология, БУТ Histology, RUT	ВЗК: 9.6 (БК: 14, ЯК: 4.5, К: 38.5) IBD: 9.6 (CD: 14, UC: 4.5, C: 38.5)	[72]*
21	23	76	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	<i>H. pylori</i> IgG (+)	ВЗК: 54.5 (БК: 52.2, ЯК: 57.1, К: 68) IBD: 54.5 (CD: 52.2, UC: 57.1, C: 68)	[78]
104	104	416	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	УДТ UDT	ВЗК: 19.7 (БК: 18.3, ЯК: 21.2, К: 48.8) IBD: 19.7 (CD: 18.3, UC: 21.2, C: 48.8)	[87]*
229	0	248	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	УДТ, гистология, культуральный метод UDT, histology, cultural method	ВЗК: 27.1 (БК: 27.1, ЯК: НД, К: 47.9) IBD: 27.1 (CD: 27.1, UC: ND, C: 47.9)	[84]*
0	153	121	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	УДТ, гистология, культуральный метод UDT, histology, cultural method	ВЗК: 30.5 (БК: НД, ЯК: 30.5, К: 57) IBD: 30.5 (CD: ND, UC: 30.5, C: 57)	[27]

Примечание. * — $p < 0,05$, НД — нет данных

Note. * — $p < 0,05$, ND — no data available.

Таблица 2. Распространенность *H. pylori* у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, принимающих препараты 5-аминосалициловой кислоты

Table 2. Prevalence of *H. pylori* in patients with inflammatory bowel disease administered with 5-aminosalicylic acid preparations

Автор Author	Распространенность <i>H. pylori</i> у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, % The prevalence of <i>H. pylori</i> in patients with inflammatory bowel disease, %	Распространенность <i>H. pylori</i> у пациентов в группе контроля, % The prevalence of <i>H. pylori</i> in patients in the control group, %
Pearce C.V. et al. [54]	ЯК: Средняя — 21,6 У пациентов, принимающих препараты 5-аминосалициловой кислоты, — 17,6 БК: Средняя — 11,9 У пациентов, принимающих препараты 5-аминосалициловой кислоты, — 3,6 UC: Average — 21.6 Patients taking 5-aminosalicylic acid preparations — 17.6 CD: Average — 11.9 Patients taking 5-aminosalicylic acid preparations — 3.6	25
Piodi L.P. et al. [57]	ВЗК — 47 У пациентов, принимающих препараты 5-аминосалициловой кислоты, — 34 IBD — 47 Patients taking 5-aminosalicylic acid preparations — 34	61

Таблица 3. Сравнительная частота встречаемости *H. pylori* (+) и *H. pylori* (–) гастрита у пациентов с ВЗКTable 3. A comparative incidence of *H. pylori* (+) and *H. pylori* (–) gastritis in patients with IBD

БК, n CD, n	ЯК, n UC, n	Группа контроля (К), n Control group (C), n	Группа контроля, диагноз(ы) Control group, diagnosis(es)	Биопсия Biopsy	<i>H. pylori</i> (+) гастрит, % <i>H. pylori</i> (+) gastritis, %	<i>H. pylori</i> (–) гастрит, % <i>H. pylori</i> (–) gastritis, %	Ссылка Reference
37	43	41	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Антрум, тело Antrum, corpus	БК: 27, ЯК: 37.2, К: 53.7 CD: 27, UC: 37.2, C: 53.7	БК: 29.6, ЯК: 22.2, К: 10.5 CD: 29.6, UC: 22.2, C: 10.5	[23]
141	79	141	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Антрум, угол, тело Antrum, angle, corpus	БК: 33, ЯК: 47, К: 60 CD: 33, UC: 47, C: 60	БК: 43, ЯК: 12, К: 19 CD: 43, UC: 12, C: 19	[51]
75	0	200	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Антрум, тело Antrum, corpus	БК: 33.3, ЯК: нД, К: 48 CD: 33.3, UC: нД, C: 48	БК: 39, ЯК: нД, К: 0.8 CD: 39, UC: нД, C: 0.8	[46]
208	280	4943	Пациенты без ВЗК Patients without IBD	Антрум, тело Antrum, corpus	БК: 4, ЯК: 6, К: 7 CD: 4, UC: 6, C: 7	БК: 5, ЯК: 0, К: 0 CD: 5, UC: 0, C: 0	[71]
67	41	43	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Антрум, тело Antrum, corpus	БК: 17.6, ЯК: 6.4, К: 20 CD: 17.6, UC: 6.4, C: 20	БК: 45.4, ЯК: 15.6, К: 30 CD: 45.4, UC: 15.6, C: 30	[11]
62	0	0	Нет данных (нД) No data (ND)	Антрум, тело Antrum, corpus	БК: 9.7, ЯК: нД, К: нД CD: 9.7, UC: нД, C: нД	БК: 32, ЯК: нД, К: нД CD: 32, UC: нД, C: нД	[20]

Морфологические изменения слизистой оболочки желудка при персистенции инфекции *H. pylori* у больных ВЗК

Установлено, что у пациентов с ВЗК преобладает умеренно выраженный активный антральный гастрит с явлениями атрофии, наибольшая степень выраженности которой наблюдается у пациентов в возрасте до 30 лет. Степень выраженности кишечной метаплазии слизистой оболочки желудка у пациентов с ВЗК зависит от длительности клинического течения заболевания. При ВЗК выраженность и активность гастрита, атрофические изменения слизистой оболочки желудка и степень инвазии *H. pylori* не зависят от длительности течения и локализации патологического процесса в кишечнике. Также у пациентов с ВЗК определяется повышенная кислотообразующая функция желудка. Базисная терапия ВЗК препаратами 5-аминосалициловой кислоты снижает выраженность и активность гастрита, степень выраженности атрофии, степень инвазии слизистой оболочки желудка *H. pylori* и риск инфицирования *H. pylori* данной категории пациентов [1] Есть данные, что препараты 5-аминосалициловой кислоты могут привести к так называемой «спонтанной эрадикации» хеликобактерной инфекции [15, 41, 51, 54, 57] (табл. 2). При постановке пациенту диагноза БК следует помнить, что изменения в желудке могут объясняться не банальным хеликобактерным гастритом, а носить специфический характер. Сравнительная частота встречаемости *H. pylori* (+) и *H. pylori* (–) гастрита у пациентов с ВЗК представлена в табл. 3. В этом случае стандартная эрадикационная терапия не будет высокоэффективной, а в ряде случаев не является необходимой. К основным эндоскопическим признакам гастродуоденальной болезни Крона, которая присутствует у 70–80% данной категории пациентов (по данным гистологического исследования), относятся: зазубренность складок Керкрина, эритема, ранимость, эрозии, линейные язвы (змеевидные, «ствол бамбука»), эффект «булыжной мостовой», утолщение складок, стриктуры [2].

В заключение следует отметить, что связь между *H. pylori*-инфекцией и ВЗК по-прежнему вызывает споры. Несомненно, изучение возможного влияния персистенции микроорганизма на развитие БК и ЯК заслуживает дальнейшего изучения. Неясно, является ли предполагаемый протективный эффект *H. pylori* у пациентов с ВЗК реальным или снижение распространенности инфекции у данной категории пациентов связано с влиянием других факторов. Необходимы дальнейшие расширенные исследования по изучению роли *H. pylori* и его эрадикации в патогенезе ВЗК.

Список литературы/References

1. Белоусова Е.И. Терапия воспалительных заболеваний кишечника: настоящее и будущее // Врач. 2002. № 2. С. 36–39. [Belousova E.I. Therapy of inflammatory bowel diseases: present and future. *Vrach = The Doctor*, 2002, no. 2, pp. 36–39. (In Russ.)]
2. Румянцев В.Г. Хеликобактерная инфекция и воспалительные заболевания кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2006. № 1. С. 72–77. [Rumyantsev V.G. Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease. *Eksperimentalnaia i klinicheskaia gastroenterologia = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2006, no. 1, pp. 72–77. (In Russ.)]
3. Успенский Ю.П., Суворов А.Н., Барышникова Н.В. Инфекция *Helicobacter pylori* в клинической практике. СПб.: ИнформМед, 2011. 572 с. [Uspenskiy Yu.P., Suvorov A.N., Baryshnikova N.V. Helicobacter pylori infection in clinical practice. *St. Petersburg: InformMed*, 2011. 572 p. (In Russ.)]
4. Ando T., Watanabe O., Ishiguro K., Maeda O., Ishikawa D., Minami M., Hasegawa M., Kondo S., Goto Y., Ohmiya N., Niwa Y., Goto H. Relationships between *Helicobacter pylori* infection status, endoscopic, histopathological findings, and cytokine production in the duodenum of Crohn's disease patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008, vol. 23, no. S2, pp. S193–S197. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05438.x
5. Basset C., Holton J., Bazeos A., Vaira D., Bloom S. Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? *Dig. Dis. Sci.*, 2004, vol. 49, pp. 1425–1432. doi: 10.1023/b:ddas.0000042241
6. Bell S.J., Chisholm S.A., Owen R.J., Borriello S.P., Kamm M.A. Evaluation of *Helicobacter* species in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003, vol. 18, no. 5, pp. 481–486. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01703.x
7. Bohr U.R., Glasbrenner B., Primus A., Zagoura A., Wex T., Malferttheiner P. Identification of enterohepatic *Helicobacter* species in patients suffering from inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, pp. 2766–2768. doi: 10.1128/jcm.42.6.2766-2768.2004
8. Caner S., Altınbaş A., Yeşil Y., Beyazit Y., Yılmaz B., Yüksel O. The relation between *Helicobacter pylori* and ulcerative colitis. *Turk. J. Med. Sci.*, 2014, vol. 44, no. 5, pp. 820–823. doi: 10.3906/sag-1305-39
9. Castaño-Rodríguez N., Kaakoush N.O., Lee W.S., Mitchell H.M. Dual role of *Helicobacter* and *Campylobacter* species in IBD: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 2017, vol. 66, no. 2, pp. 235–249. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310545
10. Chiba M., Tsuji T., Takahashi K., Komatsu M., Sugawara T., Ono I. Onset of ulcerative colitis after *Helicobacter pylori* eradication therapy: a case report. *Perm. J.*, 2016, vol. 20, no. 2, pp. e115–e118. doi: 10.7812/TPP/15-085
11. D'Inca R., Sturniolo G., Cassaro M., di Pace C., Longo G., Callegari I., Rugge M. Prevalence of upper gastrointestinal lesions and *Helicobacter pylori* infection in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 1998, vol. 43, pp. 988–992. doi: 10.1023/A:1018870415898
12. Di Tommaso A., Xiang Z., Bugnoli M., Pileri P., Figura N., Bayeli P.F., Rappuoli R., Abrignani S., De Magistris M.T. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63, pp. 1102–1106.
13. Duchmann R., Märker-Hermann E., Meyer zum Büschenfelde K.H. Bacteria-specific T-cell clones are selective in their reactivity towards different enterobacteria or *H. pylori* and increased in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.*, 1996, vol. 44, pp. 71–79. doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-273.x
14. Elizalde J.I., Gómez J., Panés J., Lozano M., Casadevall M., Ramírez J., Pizcueta P., Marco F., Rojas F.D., Granger D.N., Piqué J.M. Platelet activation in mice and human *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 100, pp. 996–1005. doi: 10.1172/jci119650
15. El-Omar E., Penman I., Cruikshank G., Dover S., Banerjee S., Williams C., McColl K.E. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulphasalazine. *Gut*, 1994, vol. 35, pp. 1385–1388. doi: 10.1136/gut.35.10.1385
16. Feeney M.A., Murphy F., Clegg A.J., Trebble T.M., Sharer N.M., Snook J.A. A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2002, vol. 14, pp. 529–534. doi: 10.1097/00042737-200205000-00010
17. Fox J.G., Boutin S.R., Handt L.K., Taylor N.S., Xu S., Rickman B., Marini R.P., Dewhirst F.E., Paster B.J., Motzel S., Klein H.J. Isolation and characterization of a novel *Helicobacter* species, “*Helicobacter Macacae*,” from rhesus monkeys with and without chronic idiopathic colitis. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, pp. 4061–4063. doi: 10.1128/JCM.01100-07
18. Garza-González E., Pérez-Pérez G.I., Mendoza-Ibarra S.I., Flores-Gutiérrez J.P., Bosques-Padilla F.J. Genetic risk factors for inflammatory bowel disease in a North-Eastern Mexican population. *Int. J. Immunogenet.*, 2010, vol. 37, pp. 355–359. doi: 10.1111/j.1744-313X.2010.00932.x
19. Grehan M., Danon S., Lee A., Daskalopoulos G., Mitchell H. Absence of mucosa-associated colonic *Helicobacters* in an Australian urban population. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, pp. 874–876. doi: 10.1128/JCM.42.2.874-876.2004
20. Halme L., Kärkkäinen P., Rautelin H., Kosunen T.U., Sipponen P. High frequency of *Helicobacter* negative gastritis in patients with Crohn's disease. *Gut*, 1996, vol. 38, pp. 379–383. doi: 10.1136/gut.38.3.379
21. Halme L., Rautelin H., Leidenius M., Kosunen T.U. Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.*, 1996, vol. 49, pp. 65–67. doi: 10.1136/jcp.49.1.65
22. Hansen R., Thomson J.M., Fox J.G., El-Omar E.M., Hold G.L. Could *Helicobacter* organisms cause inflammatory bowel disease? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 61, pp. 1–14. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00744
23. Hong C.H., Park D.I., Choi W.H., Park J.H., Kim H.J., Cho Y.K., Sohn C.I., Jeon W.K., Kim B.I., Kim D.H., Kim M.K., Chae S.W., Lee K.B., Sohn J.H., Oh S.J. The clinical usefulness of focally enhanced gastritis in Korean patients with Crohn's disease. *Korean. J. Gastroenterol.*, 2009, vol. 53, pp. 23–28
24. Huijsdens X.W., Linskens R.K., Koppes J., Tang Y.L., Meuwissen S.G., Vandenbroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H. Detection of *Helicobacter* species DNA by quantitative PCR in the gastrointestinal tract of healthy individuals and of patients with inflammatory bowel disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, vol. 41, pp. 79–84. doi: 10.1016/j.femsim.2004.01.007
25. Jergens A.E., Wilson-Welder J.H., Dorn A., Henderson A., Liu Z., Evans R.B., Hostetter J., Wannemuehler M.J. *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut*, 2007, vol. 56, pp. 934–940. doi: 10.1136/gut.2006.099242

26. Jiang H.Q., Kushnir N., Thurnheer M.C., Bos N.A., Cebra J.J. Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology*, 2002, vol. 122, pp. 1346–1354. doi: 10.1053/gast.2002.32959
27. Jin X., Chen Y.P., Chen S.H., Xiang Z. Association between *Helicobacter Pylori* infection and ulcerative colitis — a case control study from China. *Int. J. Med. Sci.*, 2013, vol. 10, no. 11, pp. 1479–1484. doi: 10.7150/ijms.6934
28. Kaakoush N.O., Holmes J., Octavia S., Man S.M., Zhang L., Castaño-Rodríguez N., Day A.S., Leach S.T., Lemberg D.A., Dutt S., Stormon M., O’Loughlin E.V., Magoffin A., Mitchell H. Detection of *Helicobacteraceae* in intestinal biopsies of children with Crohn’s disease. *Helicobacter*, 2010, vol. 15, pp. 549–557. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00792.x
29. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter*, 2004, vol. 9, pp. 115–123. doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00207.x
30. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J. Med. Microbiol.*, 2001, vol. 50, pp. 1021–1029. doi: 10.1099/0022-1317-50-12-1021
31. Keenan J.I., Beaugie C.R., Jasmann B., Potter H.C., Collett J.A., Frizelle F.A. *Helicobacter* species in the human colon. *Colorectal Dis.*, 2010, vol. 12, pp. 48–53. doi: 10.1111/j.1463-1318.2008.01672.x
32. Kelly S.M., Pitcher M.C., Farmery S.M., Gibson G.R. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology*, 1994, vol. 107, pp. 1671–1674. doi: 10.1016/0016-5085(94)90806-0
33. Krause I., Anaya J.M., Fraser A., Barzilai O., Ram M., Abad V., Arango A., García J., Shoenfeld Y. Anti-infectious antibodies and autoimmune-associated autoantibodies in patients with type I diabetes mellitus and their close family members. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2009, vol. 1173, pp. 633–639. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04619.x
34. Kullberg M.C., Ward J.M., Gorelick P.L., Caspar P., Hieny S., Cheever A., Jankovic D., Sher A. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, pp. 5157–5166.
35. Laharie D., Asencio C., Asselineau J., Bulois P., Bourreille A., Moreau J., Bonjean P., Lamarque D., Pariente A., Soulé J.C., Charachon A., Coffin B., Perez P., Mégraud F., Zerbib F. Association between entero-hepatic *Helicobacter* species and Crohn’s disease: a prospective cross-sectional study. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 2009, vol. 30, pp. 283–293. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04034.x
36. Lidar M., Langevitz P., Barzilai O., Ram M., Porat-Katz B.S., Bizzaro N., Tonutti E., Maieron R., Chowers Y., Bar-Meir S., Shoenfeld Y. Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: insinuations at a true pathogenic role. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2009, vol. 1173, pp. 640–648. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04673.x
37. Lundgren A., Strömberg E., Sjöling A., Lindholm C., Enarsson K., Edebo A., Johnsson E., Suri-Payer E., Larsson P., Rudin A., Svennerholm A.M., Lundin B.S. Mucosal FOXP3-expressing CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, pp. 523–531. doi: 10.1128/IAI.73.1.523-531.2005
38. Luther J., Dave M., Higgins P.D., Kao J.Y. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 2010, vol. 16, pp. 1077–1084. doi: 10.1002/ibd.21116
39. Man S.M., Zhang L., Day A.S., Leach S., Mitchell H. Detection of enterohepatic and gastric *Helicobacter* species in fecal specimens of children with Crohn’s disease. *Helicobacter*, 2008, vol. 13, pp. 234–238. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00607.x
40. Mansour L., El-Kalla F., Kobtan A., Abd-Elsalam S., Yousef M., Soliman S., Ali L.A., Elkhawany W., Amer I., Harras H., Hagra M.M., Elhendawy M. *Helicobacter pylori* may be an initiating factor in newly diagnosed ulcerative colitis patients: a pilot study. *World J. Clin. Cases*, 2018, vol. 6, no. 13, pp. 641–649. doi: 10.12998/wjcc.v6.i13.641
41. Mantzaris G.J., Archavlis E., Zografos C., Zavos K., Petraki K., Triadaphyllou G. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulfasalazine. *Am. J. Gastroenterol.*, 1995, vol. 90: 1900.
42. Matsumura M., Matsui T., Hatakeyama S., Mataka H., Uno H., Sakurai T., Yao T., Oishi T., Iwashita A., Fujioka T. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and correlation between severity of upper gastrointestinal lesions and *H. pylori* infection in Japanese patients with Crohn’s disease. *J. Gastroenterol.*, 2001, vol. 36, pp. 740–747. doi: 10.1007/s005350170015
43. Meining A., Bayerdörffer E., Bastlein E., Raudis N., Thiede C., Cyrus B., Krämer W., Klann H., Labenz J., Stolte M. Focal inflammatory infiltrations in gastric biopsy specimens are suggestive of Crohn’s disease. Crohn’s Disease Study Group, Germany. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1997, vol. 32, pp. 813–818. doi: 10.3109/00365529708996539
44. Meyer F., Wilson K.T., James S.P. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, pp. 6265–6272. doi: 10.1128/IAI.68.11.6265-6272.2000
45. Monceaux C.P., Testerman T.L., Bektor M., Jordan P., Adegboyega P., McGee D.J., Jennings M.H., Parker C.P., Gupta S., Yi P., Ganta V.C., Galous H., Manas K., Alexander J.S. *Helicobacter* infection decreases basal colon inflammation, but increases disease activity in experimental IBD. *Open J. Gastroenterol.*, 2013, vol. 3, pp. 177–189. doi: 10.4236/ojgas.2013.33029
46. Oberhuber G., Püspök A., Oesterreicher C., Novacek G., Zauner C., Burghuber M., Vogelsang H., Pötzi R., Stolte M., Wrba F. Focally enhanced gastritis: a frequent type of gastritis in patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology*, 1997, vol. 112, pp. 698–706. doi: 10.1053/gast.1997.v112.pm9041230
47. Oliveira A.G., das Graças Pimenta Sanna M., Rocha G.A., Rocha A.M., Santos A., Dani R., Marinho F.P., Moreira L.S., de Lourdes Abreu Ferrari M., Moura S.B., Castro L.P., Queiroz D.M. *Helicobacter* species in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, pp. 384–386. doi: 10.1128/jcm.42.1.384-386.2004
48. Oliveira A.G., Rocha, G.A., Rocha A.M., Sanna M.d., Moura S.B., Dani R., Marinho F.P., Moreira L.S., Ferrari M., Castro L.P., Queiroz D.M. Isolation of *Helicobacter pylori* from the intestinal mucosa of patients with Crohn’s disease. *Helicobacter*, vol. 11, no. 1, pp. 2–9. doi: 10.1111/j.0083-8703.2006.00368.x
49. Papamichael K., Konstantopoulos P., Mantzaris G.J. *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: is there a link? *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, pp. 6374–6385. doi: 10.3748/wjg.v20.i21.6374
50. Papamichael K.X., Papaioannou G., Karga H., Roussos A., Mantzaris G.J. *Helicobacter pylori* infection and endocrine disorders: is there a link? *World J. Gastroenterol.*, 2009, vol. 15, pp. 2701–2707. doi: 10.3748/wjg.15.2701

51. Parente F., Molteni P., Bollani S., Maconi G., Vago L., Duca P.G., Rembacken B., Axon A.T., Bianchi Porro G. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and related upper gastrointestinal lesions in patients with inflammatory bowel diseases. A cross-sectional study with matching. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1997, vol. 32, pp. 1140–1146. doi: 10.3109/00365529709002994
52. Parlak E., Ulker A., Dişibeyaz S., Alkim C., Dağlı U. There is no significant increase in the incidence of *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease in Turkey. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2001, vol. 33, pp. 87–88. doi: 10.1097/00004836-200107000-00025
53. Pascasio J.M., Hammond S., Qualman S.J. Recognition of Crohn disease on incidental gastric biopsy in childhood. *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2003, vol. 6, pp. 209–214. doi: 10.1007/s10024-002-0601-0
54. Pearce C.B., Duncan H.D., Timmis L., Green J.R. Assessment of the prevalence of infection with *Helicobacter pylori* in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2000, vol. 12, pp. 439–443. doi: 10.1097/00042737-200012040-00012
55. Pellicano R., Bresso F., Demarchi B., Bertolusso L., Sapone N., Rizzetto M., Astegiano M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease: pilot study. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2010, vol. 102, pp. 675–666. doi: 10.4321/s1130-01082010001100017
56. Perri F., Clemente R., Festa V., De Ambrosio C.C., Quitadamo M., Fusillo M., Grossi E., Andriulli A. Serum tumour necrosis factor-alpha is increased in patients with *Helicobacter pylori* infection and CagA antibodies. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1999, vol. 31, pp. 290–294.
57. Piodi L.P., Bardella M., Rocchia C., Cesana B.M., Baldassarri A., Quatrini M. Possible protective effect of 5-aminosalicylic acid on *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2003, vol. 36, pp. 22–25. doi: 10.1097/00004836-200301000-00008
58. Prónai L., Schandl L., Orosz Z., Magyar P., Tulassay Z. Lower prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease but not with chronic obstructive pulmonary disease — antibiotic use in the history does not play a significant role. *Helicobacter*, 2004, vol. 9, pp. 278–283. doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00223.x
59. Rad R., Brenner L., Bauer S., Schwendy S., Layland L., da Costa C.P., Reindl W., Dossumentkova A., Friedrich M., Saur D., Wagner H., Schmid R.M., Prinz C. CD25⁺/Foxp3⁺ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology*, 2006, vol. 131, pp. 525–537. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.001
60. Ram M., Barzilai O., Shapira Y., Anaya J.M., Tincani A., Stojanovich L., Bombardieri S., Bizzaro N., Kivity S., Agmon Levin N., Shoenfeld Y. *Helicobacter pylori* serology in autoimmune diseases — fact or fiction? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, vol. 51, pp. 1075–1082. doi: 10.1515/ccm-2012-0477
61. Reibman J., Marmor M., Filner J., Fernandez-Beros M.E., Rogers L., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. Asthma is inversely associated with *Helicobacter pylori* status in an urban population. *PLoS One*, 2008, vol. 3, e4060. doi: 10.1371/journal.pone.0004060
62. Rosania R., Von Arnim U., Link A., Rajilic-Stojanovic M., Franck C., Canbay A., Malfertheiner P., Venerito M. *Helicobacter pylori* eradication therapy is not associated with the onset of inflammatory bowel diseases. A case-control study. *J. Gastrointestin. Liver Dis.*, 2018, vol. 27, no. 2, pp. 119–125. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.272.hpy
63. Ruuska T., Vaajalahti P., Arajärvi P., Mäki M. Prospective evaluation of upper gastrointestinal mucosal lesions in children with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1994, vol. 19, pp. 181–186. doi: 10.1097/00005176-199408000-00007
64. Shinzaki S., Fujii T., Bamba S., Ogawa M., Kobayashi T., Oshita M., Tanaka H., Ozeki K., Takahashi S., Kitamoto H. Seven days triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* does not alter the disease activity of patients with inflammatory bowel disease. *Intest. Res.*, 2018, vol. 16, no. 4, pp. 609–618. doi: 10.5217/ir.2018.00044
65. Shomer N.H., Dangler C.A., Schrenzel M.D., Fox J.G. *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, pp. 4858–4864.
66. Smoot D.T., Mobley H.L., Chippendale G.R., Lewison J.F., Resau J.H. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1990, vol. 58, pp. 1992–1994.
67. Smythies L.E., Waites K.B., Lindsey J.R., Harris P.R., Ghiara P., Smith P.D. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN γ , gene-deficient mice. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, pp. 1022–1029.
68. Song M.J., Park D.I., Hwang S.J., Kim E.R., Kim Y.H., Jang B.I., Lee S.H., Ji J.S., Shin S.J. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean patients with inflammatory bowel disease, a multicenter study. *Korean J. Gastroenterol.*, 2009, vol. 53, pp. 341–347. doi: 10.4166/kjg.2009.53.6.341
69. Sonnenberg A. Review article: historic changes of *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2013, vol. 38, pp. 329–342. doi: 10.1111/apt.12380
70. Sonnenberg A., Genta R.M. Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2012, vol. 35, pp. 469–476. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04969.x
71. Sonnenberg A., Melton S.D., Genta R.M. Frequent occurrence of gastritis and duodenitis in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2011, vol. 17, pp. 39–44. doi: 10.1002/ibd.21356
72. Śladek M., Jedynek-Wasowicz U., Wedrychowicz A., Kowalska-Duplaga K., Pieczarkowski S., Fyderek K. The low prevalence of *Helicobacter pylori* gastritis in newly diagnosed inflammatory bowel disease children and adolescent. *Przegl. Lek.*, 2007, vol. 64, no. 3, pp. 65–67.
73. Streutker C.J., Bernstein C.N., Chan V.L., Riddell R.H., Croitoru K. Detection of species-specific *Helicobacter* ribosomal DNA in intestinal biopsy samples from a population-based cohort of patients with ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, pp. 660–664. doi: 10.1128/jcm.42.2.660-664.2004
74. Sturegård E., Hertervig E., Sjunnesson H., Wadström T. *Helicobacter* species in human colon biopsies. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2004, vol. 19, pp. 613–614. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01880.x
75. Thia K.T., Loftus E.V., Sandborn W.J., Yang S.K. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am. J. Gastroenterol.*, 2008, vol. 103, pp. 3167–3182. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.02158.x

76. Thomson J.M., Hansen R., Berry S.H., Hope M.E., Murray G.I., Mukhopadhyaya I., McLean M.H., Shen Z., Fox J.G., El-Omar E., Hold G.L. Enterohepatic helicobacter in ulcerative colitis: potential pathogenic entities? *PLoS One*, 2011, vol. 6: e17184. doi: 10.1371/journal.pone.0017184
77. Triantafyllidis J.K., Gikas A., Apostolidis N., Merikas E., Mallas E., Peros G. The low prevalence of helicobacter infection in patients with inflammatory bowel disease could be attributed to previous antibiotic treatment. *Am. J. Gastroenterol.*, 2003, vol. 98, pp. 1213–1214. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07434.x
78. Valle J., Kekki M., Sipponen P., Ihamäki T., Siurala M. Longterm course and consequences of Helicobacter pylori gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1996, vol. 31, pp. 546–550. doi: 10.3109/0036552960900912
79. Van Amsterdam K., van Vliet A.H., Kusters J.G., van der Ende A. Of microbe and man: determinants of Helicobacter pylori-related diseases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2006, vol. 30, pp. 131–156. doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00006.x
80. Varas-Lorenzo M.J., Muñoz-Agel F. Is Helicobacter pylori active infection increased or decreased in Crohn's disease? *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2010, vol. 102, pp. 509–510. doi: 10.4321/s1130-01082010000800013
81. Väre P.O., Heikius B., Silvennoinen J.A., Karttunen R., Niemelä S.E., Lehtola J.K., Karttunen T.J. Seroprevalence of Helicobacter pylori infection in inflammatory bowel disease: is Helicobacter pylori infection a protective factor? *Scand. J. Gastroenterol.*, 2001, vol. 36, pp. 1295–1300. doi: 10.1080/003655201317097155
82. Wagtmans M.J., Witte A.M., Taylor D.R., Biemond I., Veenendaal R.A., Verspaget H.W., Lamers C.B., van Hogezaand R.A. Low seroprevalence of Helicobacter pylori antibodies in historical sera of patients with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1997, vol. 32, pp. 712–718. doi: 10.3109/00365529708996523
83. Wehkamp J., Fellermann K., Herrlinger K.R., Bevins C.L., Stange E.F. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, vol. 2, pp. 406–415. doi: 10.1038/ncpgasthep026
84. Xiang Z., Chen Y.P., Ye Y.F., Ma K.F., Chen S.H., Zheng L., Yang Y.D., Jin X. Helicobacter pylori and Crohn's disease: a retrospective single-center study from China. *World J. Gastroenterol.*, 2013, vol. 19, pp. 4576–4581. doi: 10.3748/wjg.v19.i28.4576
85. Zhang L., Danon S.J., Grehan M., Chan V., Lee A., Mitchell H. Natural colonization with Helicobacter species and the development of inflammatory bowel disease in interleukin10-deficient mice. *Helicobacter*, 2005, vol. 10, pp. 223–230. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00314.x
86. Zhang L., Day A., McKenzie G., Mitchell H. Nongastric Helicobacter species detected in the intestinal tract of children. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, pp. 2276–2279. doi: 10.1128/jcm.02017-05
87. Zhang S., Zhong B., Chao K., Xiao Y., Cui Y., Gao X., Chen B., He Y., Hu P., Chen M., Mitchell H.M. Role of Helicobacter species in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, pp. 1987–1989. doi: 10.1128/JCM.02630-10

Авторы:

Успенский Ю.П., д.м.н., зав. кафедрой факультетской терапии им. профессора В.А. Вальдмана, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры внутренних болезней стоматологического факультета, ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

Барышникова Н.В., к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней стоматологического факультета, ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Суворов А.Н., д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, зав. кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий факультета стоматологии и медицинских технологий, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; зав. отделом молекулярной микробиологии, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Сварваль А.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов, ФБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Uspenskiy Yu.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Faculty Therapy named after professor V.A. Valdman, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; professor of the Department of Internal Medicine, Stomatological Faculty, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Baryshnikova N.V., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Internal Diseases, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher of the Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Suvorov A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, Faculty of Stomatology and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Svarval A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Pathogen Identification, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

TREATMENT OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN HIV-INFECTED PATIENTS

V.S. Smirnov^{a,b}, T.A. Kudryavtseva^b

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b JSC MBSPC “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The first reports about HIV (human immunodeficiency virus) were appeared to the 1980s. By 2017 more than 37 million people were living with HIV. Human papilloma virus (HPV) is universally spread, with some estimates showing that about 1% of the sexually active population having genital warts. Human papilloma virus (HPV)-induced infection frequently accompanies the clinical course of HIV and can manifest itself in a full spectrum of clinical-pathologic forms ranging from common warts to malignant neoplasia. Due to the widespread use of antiretroviral therapy, the number of patients with a combined infection (HIV+HPV) is steadily increasing. Here we review current clinical treatment options for HPV manifestations. High-dose antiretroviral therapy does not impede HPV treatment, and can even improve its efficacy in some cases. The topical administration of imiquimod, an immune response modifier, is an effective conservative treatment in HIV-infected patients with HPV. The immunomodulation therapy of imiquimod can serve as an effective alternative of aggressive chemical and mechanical procedures. Maximum efficacy with the lowest replaces rates may be expected from combined use of mechanical ablation methods with a subsequent follow up treatment with imiquimod. The best therapeutic result is expected in HIV-positive patients who are received high-dose antiretroviral treatment. The advantages of Vartocid, the modified Russian equivalent of the generic imiquimod.

Key words: HIV infection, human papillomavirus (HPV), HPV clinical manifestations, treatment methods, imiquimod, Aldara, Vartocid, immunomodulation therapy.

ЛЕЧЕНИЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Смирнов В.С.^{1,2}, Кудрявцева Т.А.²

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Первые сообщения о ВИЧ (вирусе иммунодефицита человека) появились в 1980-х гг. К 2017 г. более 37 млн человек жили с ВИЧ. Вирус папилломы человека (ВПЧ) распространен повсеместно, и, по некоторым оценкам, около 1% сексуально активного населения имеет генитальные бородавки. Инфекция, вызванная вирусом папилломы человека, часто сопровождает клиническое течение ВИЧ и может проявляться в полном спектре клинико-патологических форм, от обычных бородавок до злокачественных неоплазий. В связи с широким применением антиретровирусной терапии число пациентов с сочетанной инфекцией (ВИЧ+ВПЧ) неуклонно растет. Здесь мы рассмотрим текущие клинические варианты лечения проявлений ВПЧ. Антиретровирусная терапия в высоких дозах не препятствует лечению ВПЧ, а в некоторых случаях даже может повысить ее эффективность. Местное введение имиквимода, модификатора иммунного ответа, является эффективным

Адрес для переписки:

Смирнов Вячеслав Сергеевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени 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:

Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А. Лечение папилломавирусной инфекции человека у ВИЧ-инфицированных пациентов // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-ТОН-1233

Citation:

Smirnov V.S., Kudryavtseva T.A. Treatment of human papillomavirus infection in HIV-infected patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-ТОН-1233

консервативным лечением пациентов с ВИЧ, инфицированных ВПЧ. Иммуномодулирующая терапия имиквимодом может служить эффективной альтернативой агрессивным химическим и механическим терапевтическим процедурам. Максимальная эффективность с самыми низкими показателями замещения может ожидать от комбинированного использования методов механической абляции с последующим местным применением имиквимода в виде крема на зону абляции после заживления раны. Наилучший терапевтический результат ожидается у ВИЧ-положительных пациентов, получающих антиретровирусное лечение в высоких дозах. Обсуждаются преимущества «Вартоцида», модифицированного российского эквивалента дженерика имиквимода.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, вирус папилломы человека (ВПЧ), клинические проявления ВПЧ, методы лечения, имиквимод, «Альдара», «Вартоцид», иммуномодулирующая терапия.

Introduction

The first registered case of secondary human immunodeficiency (HIV) induced by a retrovirus of the same name dates back to the 1980s. The disease quickly spread throughout the world, reaching pandemic proportions and posing a global problem. The current epidemic state and poor results of pandemic control are associated primarily with the tropism of the virus, which persists mainly in the CD4⁺ cell population of the infected patient [29]. By 2012, more than 33 million people died of HIV infection, and as of 2017, more than 37 million people were living with HIV, 18 million of them contracting the disease for the first time [12, 21]. African countries in the sub-Saharan region account for more than 70% of all HIV infections. In non-African populations, the virus is most prevalent among persons who inject drugs, people undergoing medical manipulations get infected less frequently (Table).

Russia has the world's third-biggest incidence of HIV infection [1] with 1.4 million estimated as being infected at 30 September, 2020 [3]. In 2018, 86,519 new cases were reported, 941 of these being children. The following 13 regions account for more than a half (59.0%) of all reported HIV cases: Kemerovo Oblast, Novosibirsk Oblast, Perm Krai, Moscow, Irkutsk Oblast, Sverdlovsk Oblast,

Samara Oblast, Krasnodar Krai, Saint Petersburg, Krasnoyarsk Krai, the Republic of Bashkortostan, Chelyabinsk Oblast, and Moscow Oblast. Despite these worrying statistics, antiretroviral therapy, which has been widely used in developed countries since the end of the 1990s, significantly influenced the survival rates among HIV-infected subjects and reduced the total number of infected cases, especially those infected by mother-to-child transmission.

The deterioration and functional suppression of normal innate and acquired immunity systems by HIV induces a plethora of diseases, both infectious and non-infectious in etiology. These include various types of malignant tumors and a large number of opportunistic infections induced by *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, hepatitis virus, and various serotypes of papillomaviruses [17, 19].

Human papillomaviruses (HPV) are universally spread, with some estimates showing that about 1% of the sexually active population having genital warts [4]. This disease is asymptomatic in 5–40% cases and can remain latent for decades.

Genital warts are always caused by human papillomaviruses, which hold a significant position among the opportunistic infections characteristic of HIV infections, where warts and papillomas occur much more frequently and tend to manifest themselves in severe and/or recurrent attacks [2]. Among the large number of diseases of papillomaviral etiology which are found in HIV-infected persons, almost all forms of pathology can be encountered: from genital warts and pointed condyloma to cervical cancer, malignant vulvovaginal neoplasia, and anal squamous intraepithelial neoplasia [15, 25]. HPV prevalence among HIV-infected persons remains high even in patients receiving active retroviral therapy [32]. Benign pointed condyloma and various malignant neoplasias, such as anal squamous intraepithelial neoplasia, vulvovaginal neoplasia, and cervical cancer, are most prevalent [9, 15, 25].

Many current treatment methods are used for these diseases, ranging from mechanical dissection and laser vaporization to removal of tumors with chemical and immunomodulating agents [25].

Table. HIV prevalence among population groups [33]

Vulnerable group	Prevalence, %	Incidence, %	Incidence per 100,000 persons
Persons who inject drugs	45.0	23.18	12.977
Their sexual partners	8.0	5.15	3.601
Female sex workers	9.0	3.23	905
Their clients	4.0	4.07	91
Men who have sex with men	5.0	13.17	983
Their female sexual partners	2.0	2.06	308
Occasional heterosexual intercourse	2.0	3.27	146
Medical injections	1.10	0.58	1

Anogenital warts

Anogenital warts are the most prevalent manifestation of papillomavirus infection in men who have sex with men (MSM). From the full spectrum of the virus serotypes, the persistence of serotypes 16 and 18 is the primary reason for the development of precancerous and cancerous lesions of the anogenital tract. Viruses of other serotypes, such as HIV 32, 42, 43, 44, 54, etc., promote the growth of common and anogenital warts of low malignancy [2].

Any treatment method may be applied in HIV-infected subjects with common and anogenital warts, including surgical removal, cryotherapy, electrocoagulation, or chemical removal with podophyllin and trichloroacetic acid.

However, the use of aggressive chemical and mechanical procedures may be inadvisable where the patient is undergoing high-dose antiretroviral therapy or otherwise is in poor general condition [24]. In such cases, immunomodulating therapy with imiquimod can serve as an effective alternative [26, 18]. Until recently, the only existing brand of this drug was Aldara® [10]. Lately, generic equivalents have appeared on the market as well. These include the modified generic drug Vartocid produced by JSC MBSPC "Cytomed" [2].

Results reported for the original imiquimod drug (Aldara®) demonstrated complete disappearance of external genital and perianal warts in 50% following treatment of immunocompetent patients. However, this effect was significantly reduced in HIV-infected patients, although it was improved in cases of concomitant antiretroviral therapy [26, 30]. According to the authors, the rate of complete clearance of warts in HIV-infected subjects treated with the original medication 5 times per week over a 16-week course was reported as 32%. At the same time, viral DNA was detected even at the end of the treatment, involving coinfection by both benign and malignant serotypes [16]. It was possible to achieve complete viral elimination only after a refresher 16-week course of treatment.

Another study compared the efficacy of imiquimod treatment of external genital warts in HIV-positive and HIV-negative patients. Imiquimod was administered 3 times per week in a course of up to 16 weeks. Among HIV-positive subjects, complete clearance of external genital warts was observed in 31% of patients, partial clearance in 24%, and no effect was reported in 45% of patients. In the immunocompetent HIV-negative patient group, complete clearance was observed in 62% of cases, partial clearance in 24%, and no effect in 14%. Recurrence of disease was observed in 4 of 23 patients with HIV and in 2 of 31 HIV-negative subjects. The medication was well tolerated by patients, with side effects of burning sensation and hyperemia scored as minor and moderate. The authors concluded that topical 5%

imiquimod cream has acceptable efficacy and safety in HIV-positive subjects [28].

Thus, the administration of 5% imiquimod cream for the treatment of external anogenital warts in HIV-infected subjects is an adequate therapy with high compliance and no significant side effects. At the same time, antiretroviral therapy not only doesn't impede the treatment of anogenital warts, and in a number of cases may also increase the elimination of HPV.

The results quoted were achieved for the original Aldara® medication. As indicated above, there are a large number of generics, one of them being a Russian drug Vartocid. In essence, it is a complete equivalent of the original Aldara® drug in terms of the active substance. However, in the process of designing the equivalent, we were challenged by the low solubility of this compound and the difficulty in formulating an adequate cream in the form of an oil-in-water emulsion. The solution was found by adding oleic acid and diethylene glycol monoethyl ether to the ointment base. The result was a homogenous emulsion, as confirmed by microscopic findings (see cover II).

As shown in Fig., the dispersion rate of the generic drug Vartocid equals or even slightly exceeds the original Aldara® cream. Treatment with 5% Vartocid cream by medical practitioners shows a higher efficacy of this medication in comparison to a generic equivalent Kerawort, due to possibly not only higher dispersity, but also better penetrative properties. As indicated in anecdotal reports of medical practitioners, administering Vartocid even 3 times a week results in better efficacy than the administration of Kerawort 5 times a week, and with minimal side effects or absence thereof [2].

Squamous anal intraepithelial neoplasia (AIN) and anal cancer

Papillomaviral serotypes of high malignancy are widespread among MSM and frequently cause AIN [27]. AIN is a precancerous lesion of the anal mucosa, which in turn precedes anal cancer [22]. The highest HPV-associated risk factors are HIV infection, anal sex, and sexual behavior exhibiting a frequent change of sexual partners. The development of AIN takes several years, therefore continuous clinical supervision of such patients can prevent the development of the neoplasia [25]. One study revealed 15% cases of persistent HPV of low malignancy risk and 5% HPV of high malignancy risk among 1,262 HIV-negative MSM [19]. In other words, HIV is a contributory cause to AIN development, but the virus can also persist in the absence of HIV. The treatment of AIN and anal cancer in HIV-positive subjects includes various methods for papilloma removal: surgical dissection, destructive therapy in the form of radiofrequency (RF) ablation or electrocoagulation, chemical destruction with trichloroacetic acid or 5-fluorouracil, and imiquimod immunomodulating

therapy. Each of the above-mentioned methods has its advantages and disadvantages.

Surgical removal of AIN, used when the site of damage is large, often requires significant removal of normal tissue. Besides, it is associated with a high relapse incidence (9–63%) [25]. Moreover, surgical treatment is often associated with severe pain in post-surgery period. RF-therapy was followed by elimination in 64% of subjects in the course of 140 days of monitoring. However, the relapse rate in HIV-positive MSM reached 64% in the course of 14 months of monitoring and 91% in the course of 17 months [9]. Electrocoagulation demonstrated complete response in 32.5% of cases, but 33.7% failed to provide positive results. Relapse in the course of the two-year follow-up was observed in 79% of patients. Local topical treatment with trichloroacetic acid (TCA) demonstrated complete elimination in 71–79% cases, and prescribing 5-fluorouracil led to complete clearance in 39%, partial clearance in 17%, and no effect in 37%. Relapse rates for both treatments reached up to 50% [5].

The alternative to TCA and 5-fluorouracil is the use of imiquimod. Fox et al. [2010] measured the efficacy of imiquimod for AIN in 53 HIV-positive MSM, 28 of whom received imiquimod, and 25 placebo. Complete or partial clearance was seen in 43% of cases among 28 subjects receiving imiquimod, and sustained response after 36 months of the medication administration in 61%. Kreuter et al. [11] conducted a concurrent study of AIN treatment efficacy in HIV-infected MSM. The overall monitoring time was 30.3 months. During this period, 17 (74%) out of 19 monitored subjects remained AIN-free. HPV relapse occurred in five subjects (26%) in the course of an average of 24.6 months. Simultaneously with papilloma clearance, a reduction in the number of HPV serotypes was noted. However, full viral clearance could not be achieved, and some patients developed AIN lesions on the untreated skin areas. This situation necessitates the monitoring of patients after AIN elimination for further efficient anti-relapse treatment.

The most probable outcome of AIN in HIV-positive MSM is its transformation to anogenital cancer [28]. It has been demonstrated that subjects who have been HIV-positive for more than 15 years get cancer 12 times more often than those infected for less than 5 years. Infrared coagulation therapy is used for treatment, with efficacy ranging from 35% to 65% in the course of 6 to 14 months of monitoring. The procedure was well tolerated, with reports of only mild to moderate anal pain, bleeding being the most prevalent side effect. TCA is used for the same purpose. The procedure was demonstrated to be safe and well tolerated. Therapeutic effect in HIV-positive subjects can reach 87%, however subsequent relapse over the following 24 months is also reported more often than for other interventions.

As of 2010, imiquimod was not approved for treating anogenital cancer in HIV-positive MSM. However, the studies have shown that it is efficient and well tolerated. In the course of 9 months monitoring, clearance was registered in the range of 46–74%. Relapse, which occurred in 29% patients, was confined to areas not treated with imiquimod.

Therefore, the methods of anal intraepithelial lesion treatment in HIV-positive MSM are, in essence, no different from those used in HIV-negative subjects. A better tolerance of imiquimod is the only thing of note in this regard. We have no conclusive data on the results of using Russian generic drug Vartocid for treating anogenital pathologies. However, it may be assumed that Vartocid, having an improved formula and better penetrative qualities, may show higher efficacy, even in smaller doses.

Imiquimod and papillomaviral pathology in HIV-positive women

HPV infection is a common genital tract pathology in HIV-infected women [24]. It is assumed that various forms of HPV occur in about 60% of HIV-positive women [23]. With genital warts being most prevalent, including vulvovaginal warts, pointed condylomas, and vulvovaginal and cervical papillomas. The latter are prone to various types of cancerization in HIV-positive women [25]. In general, HPV treatment in HIV-positive women does not differ from the treatment of any other patients with various forms of papillomatosis. The basis for therapy approach is not the elimination of the virus, but the removal of external symptoms [2]. The complete spectrum of therapeutic methods, from cryotherapy to immunomodulating therapy, is used for that purpose [11]. The overall therapy efficacy parameters and relapse rates also show no correlation with the presence or absence of HIV in a patient. In a considerable number of cases, the use of imiquimod for treating cervical papilloma, neoplasia and cancer as monotherapy or in combination with physical ablation methods permits the achievement of a steady remission with a significantly reduced relapse rate. Some increase in the therapeutic effect may be achieved by concomitant high-dose retroviral therapy.

Conclusion

In summarizing the reported data, it is worth emphasizing that HIV infection is frequently accompanied by HPV activation, promoting papillomatosis of differing localization. At the same time, a common problem is the persistence of viral serotypes with high malignancy risks, including squamous carcinoma or cervical cancer. Today there are no methods for total elimination of the virus, therefore therapy is focused on treating the morphological consequences of the infection. The full range of therapeutic

tic interventions is employed for this purpose: from surgical dissection to immunomodulating therapy with imiquimod [6, 13, 14]. In general, all these interventions achieve comparable results in the elimination of lesions in 50–90% of cases. At the same time, the relapse risk in the course of the first year of monitoring can reach 50% for mechanical, thermal and laser excision. A slightly lower relapse rate is observed for immunomodulating therapy with imiquimod. Due to deeper penetration of imiquimod the affected area, the modified composition of 5% cream Vartocid, developed in Russia, may permit higher efficacy with less frequent dosing. Maximum efficacy with the lowest relapse rates may be expected from combined use of mechanical ablation methods (cryodestruction, electrocoagulation, laser vaporization) with a subsequent follow-up treatment with imiquimod. At the same time, the best therapeutic re-

sult is expected in HIV-positive subjects who are receiving high-dose antiretroviral treatment. As for the imiquimod treatment regimen, it should be emphasized that it does not differ for HIV-negative patients. The medication is applied topically for 8 hours directly to the HPV-affected area 5 times per week. The full treatment course takes 16 weeks. In case of persistent relapses, the course may be repeated after a week-long break. In case of combined therapy, it is essential to wait until the wound heals after the physical removal of a lesion, before commencing a regular imiquimod treatment course.

Acknowledgment

The authors thank Mr. G. Redlich BA LLB DUniv for their invaluable assistance in working on the manuscript.

References

1. Покровский В.В. Синдром приобретенного иммунодефицита в России // Терапевтический архив. 2016, Т. 88, № 11. С. 4–11. [Pokrovsky V.V. Acquired immunodeficiency syndrome in Russia. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, vol. 88, no. 11, pp. 4–11. (In Russ.)] doi: 10.17116/terarkh201688114-11
2. Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А. Вартоцид (Имиквимод). СПб.: Гиппократ, 2017. 141 с. [Smirnov V.S., Kudryavtseva T.A. Vartocid (Imiquimod). *St. Petersburg: Hippocrates*, 2017. 141 p. (In Russ.)]
3. Федеральный научно-методический Центр по профилактике и борьбе со СПИДом. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 30 сентября 2020 г. [Federal Research Center for AIDS Prevention and Control. HIV-infection in Russian Federation for 30th of September, 2020] URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/11/Spravka-VICH-v-Rossii-9-mes-2020.pdf> (27.11.2020)
4. Cardoso J.C., Calonje E. Cutaneous manifestation of human papillomaviruses: a review. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica. Adriat.*, 2011, vol. 20, no. 3, pp. 145–154.
5. Fox P.A., Nathan M., Francis N., Singh N., Weir J., Dixon G., Barton S.E., Bower M.A. Double-blind, randomized controlled trial of the use of imiquimod cream for the treatment of anal canal high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive MSM on HAART, with long-term follow-up data including the use of open-label imiquimod. *AIDS*, 2010, vol. 24, no. 15, pp. 2331–2335. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833d466c
6. Garland S.M. Imiquimod. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 16, no. 2, pp. 151–160.
7. Godfrey J.C., Vaughan M.C., Williams J.V. Successful treatment of bowenoid papulosis in a 9-year-old girl with vertical acquired human immunodeficiency virus. *Pediatrics*, 2003, vol. 112, no. 1, pp. e73–e76. doi: 10.1542/peds.112.1.e73
8. Goldstone S., Palefsky J.M., Giuliano A.R. Prevalence of and risk factors for human papillomavirus (HPV) infection among HIV-seronegative men who have sex with men. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 203, no. 1, pp. 66–74. doi: 10.1093/infdis/jiq016
9. Gormley R.H., Kovarik C.L. Dermatologic manifestations of HPV in HIV-infected individuals. *Curr. HIV/AIDS Rep.*, 2009, vol. 6, no. 3, pp. 130–138. doi: 10.1007/s11904-009-0018-8
10. Gupta A.K., Browne M., Bluhm R. Imiquimod: a review. *J. Cutan. Med. Surg.*, 2002, vol. 6, no. 6, pp. 554–560. doi: 10.1007/s10227-001-0134-6
11. Hampson L., Martin-Hirsch P., Hampson I.N. An overview of early investigational drugs for the treatment of human papilloma virus infection and associated dysplasia. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, 2015, vol. 24, no. 12, pp. 1529–1537. doi: 10.1517/13543784.2015.1099628
12. Hemelaar J., Elangovan R., Yun J., Dickson-Tetteh L., Fleminger I., Kirtley S., Williams B., Gouws-Williams E., Ghys P.D.; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation Characterisation. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2019, vol. 19, no. 2, pp. 143–155. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30647-9
13. Hengge U.R., Benninghoff B., Ruzicka T., Gross M. Topical immunomodulators — progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *Lancet Infect. Dis.*, 2001, vol. 1, no. 3, pp. 189–198.
14. Hengge U.R., Ruzicka T. Topical immunomodulation on in dermatology potential of toll-like receptor agonists. *Dermatol. Surg.*, 2004, vol. 30, no. 8, pp. 1101–1112.
15. Hidalgo-Tenorio C., de Jesus S.E., Esquivias J., Pasquau J. High prevalence and incidence of HPV-related anal cancer precursor lesions in HIV-positive women in the late HAART era. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2018, vol. 36, no. 9, pp. 555–562. doi: 10.1016/j.eimc.2017.10.014
16. Kreuter A., Potthoff A., Brockmeyer N.H., Gambichler T., Stücker M., Altmeyer P., Swoboda J., Pfister H., Wieland U.; German Competence Network HIV/AIDS. Imiquimod leads to a decrease of human papillomavirus DNA and to a sustained clearance of anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected men. *J. Invest. Dermatol.*, 2008, vol. 128, no. 8, pp. 2078–2083. doi: 10.1038/jid.2008.24

17. Krishnamurti U., Unger E.R. Pathobiology of human papillomaviruses in human immunodeficiency virus — infected persons. *Semin. Diagn. Pathol.*, 2017, vol. 34, no. 4, pp. 364–370. doi: 10.1053/j.semdp.2017.04.005.
18. Lim J.H.-L., Lim K.-S., Chong W.-S. Dramatic clearance of HIV-associated bowenoid papulosis using combined oral acitretin and topical 5% Imiquimod. *J. Drugs Dermatol.*, 2014, vol. 13, no. 8, pp. 901–902.
19. Lucas S., Nelson A.M. HIV and the spectrum of human disease. *J. Pathol.*, 2015, vol. 235, no. 2, pp. 229–241. doi: 10.1002/path.4449.
20. Mbulawa Z.Z., Marais D.J., Johnson L.F., Boule A., Coetzee D., Williamson A.L. Influence of human immunodeficiency virus and CD4 count on the prevalence of human papillomavirus in heterosexual couples. *J. Gen. Virol.*, 2010, vol. 91, no. 12, pp. 3023–3031. doi: 10.1099/vir.0.020669-0.
21. Miles to go — Global AIDS Update 2018. Geneva: UNAIDS, 2018. 268 p. URL: https://www.unaids.org/en/20180718_GR2018 (27.11.2020)
22. Newsom-Davis T., Bower M. HIV-associated anal cancer. *F1000 Med. Rep.*, 2010, vol. 2, no. 1: 85. doi: 10.3410/M2-85
23. Obiri-Yeboah D., Akakpo P.K., Mutocheluh M., Adjei-Danso E., Allornuvor G., Amoako-Sakyi D., Adu-Sarkodie Y., Mayaud P. Epidemiology of cervical human papillomavirus (HPV) infection and squamous intraepithelial lesions (SIL) among a cohort of HIV-infected and uninfected Ghanaian women. *BMC Cancer*, 2017, vol. 17, no. 1: 688. doi: 10.1186/s12885-017-3682-x
24. Redondo P., Lloret P. Topical imiquimod for bowenoid papulosis in an HIV-positive woman. *Acta Derm. Venereol.*, 2002, vol. 82, no. 3, pp. 212–213. doi: 10.1080/00015550260132550
25. Roberts J.R., Siekas L.L., Kaz A.M. Anal intraepithelial neoplasia: a review of diagnosis and management. *World J. Gastrointest. Oncol.*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 50–61. doi: 10.4251/wjgo.v9.i2.50

Авторы:

Смирнов В.С., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, главный научный сотрудник АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;
Кудрявцева Т.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник научного отдела, АО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Smirnov V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head Researcher, JSC MBSPC "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation;
Kudryavtseva T.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Scientific Department, MBRD "Cytomed", St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.06.2019
Отправлена на доработку 23.05.2020
Принята к печати 04.07.2020

Received 22.06.2019
Revision received 23.05.2020
Accepted 04.07.2020

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ ПНЕВМОКОККОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У МЫШЕЙ

Н.К. Ахматова¹, И.М. Грубер¹, О.М. Кукина¹, Э.А. Ахматова¹, И.Д. Макаренкова², В.Н. Столпникова¹, Е.О. Калининченко¹, И.А. Бишева¹, С.А. Сходова¹

¹ ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

Резюме. Ключевую роль в инициации иммунных реакций играют дендритные клетки — наиболее активные и высокоспециализированные антигенпрезентирующие клетки. В настоящее время актуальна разработка препаратов, активирующих дендритные клетки для создания противоиных инфекционных и противоопухолевых вакцин. Перспективными для усиления активности дендритных клеток являются препараты микробного происхождения, поскольку они несут лиганды для Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета. К таким препаратам относятся экспериментальные белоксодержащие пневмококковые препараты. В данном исследовании их получали из инактивированной ацетоном микробной массы депонированного вакцинного штамма *S. pneumoniae* 6B № 296 с последующей водной экстракцией и выделением фракции 30–100 kDa. Дендритные клетки получали из клеток костного мозга мышей линии СВА (n = 15). Клетки культивировали в полной ростовой среде RPMI-1640 в присутствии рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). На шестые сутки в культуру незрелых дендритных клеток вносили экспериментальные белоксодержащие пневмококковые препараты (50 мкл/мл). В качестве классического индуктора созревания использовали коммерческий TNF α (20 нг/мл, Biosource, США). Иммунофенотип дендритных клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием FITC- и PE-меченых моноклональных антител к клеточным рецепторам: CD34, CD38, CD83, CD86, CD80, CD11c, MHC II, CD14, CD282 (TLR2), CD-284 (TLR4) (eBioscience, США). При изучении влияния экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на созревание дендритных клеток установлено, что морфологические характеристики дендритных клеток при использовании в качестве индуктора созревания экспериментальных белоксодержащих препаратов не имеют существенных различий между собой и с классическим индуктором созревания TNF α . Клетки характеризовались крупными размерами, имели овальную или неправильную форму с вуалевидной цитоплазмой, эксцентрично расположенным ядром и многочисленными длинными тонкими отростками. Данные препараты в культуре дендритных клеток вызвали снижение численности CD34⁺ незрелых клеток и TLR2/TLR4⁺ DC, повышали количество клеток с маркером адгезии CD38⁺, активационными MHC II⁺, костимулирующими CD80/CD86⁺ молекулами и маркером терминальной дифференцировки CD83⁺, что может свидетельствовать о процессах дифференцировки дендритных клеток при их созревании. Фракция 30–100 kDa в большей степени увеличивала численность клеток с молекулами адгезии по сравнению с водным экстрактом, который

Адрес для переписки:

Ахматова Нэлли Кимовна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 919 776-55-70. E-mail: anelly@mail.ru

Contacts:

Nelli K. Akhmatova
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazennyi lane, 5a,
Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera.
Phone: +7 919 776-55-70. E-mail: anelly@mail.ru

Для цитирования:

Ахматова Н.К., Грубер И.М., Кукина О.М., Ахматова Э.А., Макаренкова И.Д., Столпникова В.Н., Калининченко Е.О., Бишева И.А., Сходова С.А. Влияние экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на созревание дендритных клеток у мышей // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 85–92. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-1218

Citation:

Akhmatova N.K., Gruber I.M., Kukina O.M., Akhmatova E.A., Makarenkova I.D., Stolpnikova V.N., Kalinichenko E.O., Bisheva I.A., Skhodova S.A. Effects of experimental protein-containing pneumococcal preparations on maturation of murine dendritic cells // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 85–92. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-1218

значительнее стимулировал нарастание количества дендритных клеток с экспрессией костимулирующих молекул по сравнению с фракцией 30–100 kDa ($p < 0,05$). Активность исследуемых препаратов в отношении влияния на CD83⁺ клетки была сопоставимой. Показано, что экспериментальные белоксодержащие антигены вакцинного штамма пневмококка индуцируют созревание дендритных клеток из костномозговых предшественников и снижение численности TLR2- и TLR4-экспрессирующих клеток, что свидетельствует об активизирующем влиянии на эффекторы врожденного иммунитета.

Ключевые слова: экспериментальные белоксодержащие препараты, дендритные клетки, пневмококк, индукция созревания, иммунофенотип, морфологические характеристики.

EFFECTS OF EXPERIMENTAL PROTEIN-CONTAINING PNEUMOCOCCAL PREPARATIONS ON MATURATION OF MURINE DENDRITIC CELLS

Akhmatova N.K.^a, Gruber I.M.^a, Kukina O.M.^a, Akhmatova E.A.^a, Makarenkova I.D.^b, Stolpnikova V.N.^a, Kalinichenko E.O.^a, Bisheva I.A.^a, Skhodova S.A.^a

^a *Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

^b *Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation*

Abstract. Dendritic cells as the most active and highly specialized antigen presenting cells, play a key role in initiating immune responses. Currently, generation of medications activating dendritic cells for development of anti-infective and anticancer vaccines is of highly relevance. Preparations of microbial origin are promising to augment activity of dendritic cells, because they carry innate immune ligands for Toll-like receptors. Such preparations include experimental protein-containing pneumococcal preparations, obtained from acetone-inactivated microbial mass of the deposited *S. pneumoniae* 6B vaccine strain No. 296, followed by aqueous extraction and separation of 30–100 kDa fraction. Dendritic cells were obtained from bone marrow cells of CBA mice ($n = 15$), and cultured in complete growth medium RPMI-1640 added with recombinant GM-CSF and IL-4 (Biosource, USA). On day 6, experimental protein-containing pneumococcal preparations (50 μ l/ml) were administered to the cultured immature dendritic cells. Commercial TNF α (20 ng/ml, Biosource, USA) was used as a standard maturation inducer (positive control). Immunophenotyping of dendritic cells was conducted by using flow cytometry with FITC- and PE-labeled monoclonal antibodies against cell surface receptors: CD34, CD38, CD83, CD86, CD80, CD11c, MHC II, CD14, CD282 (TLR2), CD284 (TLR4), (eBioscience, USA). Studying an effect of preparations on maturation of dendritic cells revealed that morphological characteristics of dendritic cells generated by using experimental protein-containing preparations did not differ significantly between each other as well as those induced by TNF α . The cells were characterized by large sizes, oval or irregular shape, veiled cytoplasm, eccentrically located nucleus and numerous long thin protrusions. Experimental protein-containing preparations induced in cultured dendritic cells decrease in count of CD34⁺ immature and TLR2/TLR4⁺ cells, increased count of cells expressing markers of adhesion (CD38⁺), activation (MHC II⁺), costimulation (CD80/CD86⁺) and terminal differentiation (CD83⁺), which may evidence about events of differentiation upon dendritic cell maturation. The 30–100 kDa fraction increased count of cells expressing adhesion molecules to a greater extent than aqueous extract that more pronouncedly stimulated rise in count of dendritic cells bearing costimulatory molecules ($p < 0.05$). The activity of the examined proteins regarding their effect on CD83⁺ cells was comparable. Experimental protein-containing antigens derived from pneumococcal vaccine strain were shown to induce maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induce a decrease in the count of TLR2 and TLR4-expressing cells accounting for activating effect on innate immune effectors.

Key words: experimental protein-containing pneumococcal preparations, dendritic cells, pneumococcus, maturation induction, immunophenotype, morphological characteristics.

Введение

Дендритные клетки (DC) являются высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, играющими ключевую роль в инициации иммунных реакций; они обладают способностью регулировать иммунные процессы в организме и поддерживать гомеостаз иммунокомпетентных клеток [1, 3, 16].

Способность DC эффективно представлять антиген Т-лимфоцитам активно используется для генерации специфических иммунных кле-

ток-эффекторов и для создания противоинфекционных и противоопухолевых вакцин [2, 6, 11].

Будучи ключевыми эффекторами врожденного иммунитета, DC выполняют функцию связующего звена между врожденным и адаптивным иммунитетом, обеспечивая процессинг и представление антигена Т-лимфоцитам. В результате распознавания дендритными клетками патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs) происходит передача сигналов, активирующих ядерный транскрип-

ционный фактор NF-κB с каскадом иммунных реакций, обеспечивающих не только первую линию защиты от патогена, но и формирование адаптивного иммунного ответа с поляризацией Т-хелперов по Th-1/Th-2 типу [5]. В настоящее время остается актуальным поиск препаратов, активирующих DC. Наиболее перспективным считается применение препаратов микробного происхождения, поскольку они несут лиганды для Toll-подобных рецепторов (TLRs) системы врожденного иммунитета. К таким препаратам относятся экспериментальные белоксодержащие пневмококковые препараты (ЭБСП), имеющие в своем составе PAMPs, которые с большой вероятностью могут быть обнаружены TLRs антигенпрезентирующих клеток.

Материалы и методы

Мыши. Мышей линии СВА массой 18–20 г получали из питомника «Андреевка» Московской области. Для выделения DC использовали клетки костного мозга 20 мышей. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Препараты. ЭБСП выделяли из инактивированной ацетоном микробной массы депонированного вакцинного штамма *S. pneumoniae* 6В № 296, с последующей водной экстракцией (ВЭ) и выделением фракции 30–100 kDa (ФР) с использованием фильтров Amicon® Ultra (Millipore, Ирландия) с порогом отсека 100 и 30 kDa.

Культивирование DC. DC получали из клеток костного мозга мышей линии СВА. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), трижды осаждали центрифугированием (250 г x 5 мин) и переводили в обогащенную среду культивирования (10^6 клеток в 1 мл среды RPMI-1640) с добавлением 10 мкг/мл гентамицина сульфата (AppliChem, Германия) и 10%-ной термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки — ЭТС (Thermo Fisher Scientific, США), содержащую по 20 нг/мл рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). На шестые сутки производили смену среды и в культуру незрелых DC мышей вносили ЭБСП (ВЭ или ФР) по 50 мкл/мл культуральной жидкости. В качестве классического индуктора созревания (позитивный контроль) использовали коммерческий TNFα (20 нг/мл, Biosource, США).

Оценку иммунофенотипа DC осуществляли методом проточной цитометрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (МКА) (eBiosciences, США), меченных флуорохромом, к определяемому маркеру: CD34-FITC

(clone RAM 34, кат. № 11-0341-82), CD38-FITS (clone 90, кат. № 11-0381-82), CD83-PE (clone Michel-17, кат. № 12-0831-80), CD86-PE (GL-1, кат. № 120862-81), CD80-FITS (clone 16-10A1, кат. № 11-0801-82), CD11c-FITS (clone 418, кат. № 11-0114-81), MHC II-FITS (clone NIMR-4, кат. № 11-5322-82), CD14-PE (clone Sa2-8, кат. № 12-0141-82), CD282 (TLR2)-FITS (clone 6C2, кат. № 11-9021-82), CD-284 (TLR4)-PE (clone UT41, кат. № 12-9041-80) (eBioscience, США).

Фиксация и окраска клеток. Клетки культивировали в культуральных плоскодонных планшетах (Corning Costar, США) с покровным стеклом 24, 48 или 72 ч. Отбирали среду из лунок со стеклами и фиксировали клетки 3,7%-ным раствором параформальдегида (Panreas, Испания) на PBS 15 мин при комнатной температуре. Окраску актинового цитоскелета производили с использованием фаллоидина с флуоресцентным красителем (Alexa Fluor 594 phalloidin, Invitrogen) в разведении 1:150. Молекулу ДНК клеток окрашивали водным раствором красителя Hoechst 33342 (Sigma), разведенным до концентрации 1 мкг/мл.

Получение снимков DC, окрашенных антителами. Фотографии клеток на стеклах делали при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti-U, оснащенного камерой Infinity 3 и флуоресцентными фильтрами UV-1A (для препаратов, окрашенных красителем Hoechst 33342 [Sigma]), В-2А (для наблюдения флуоресценции в зеленом диапазоне) и G-2А (для наблюдения флуоресценции в красном диапазоне).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием теста Kruskal–Wallis. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты

Клетки, дифференцированные из клеток предшественников костного мозга мышей, представляли собой особый клеточный тип, характеризующийся звездчатыми формами с ветвящимися цитоплазматическими отростками, что позволяет отнести их к дендритным клеткам, описанным ранее рядом исследователей [1, 4, 6, 11, 12]. При культивировании в плоскодонных планшетах на покровных стеклах определялись клетки крупных размеров овальной или неправильной формы с вуалевидной цитоплазмой, эксцентрично расположенным ядром и многочисленными длинными тонкими отростками (рис.).

Дифференцировку клеток-предшественников в зрелые DC под воздействием эксперимен-

тальных белоксодержащих пневмококковых препаратов (ЭБСП) у мышей оценивали по изменению иммунофенотипа клеток.

При культивировании клеток костного мозга в присутствии GM-CSF и IL-4 на шестые сутки они приобретали фенотипические признаки незрелых DC, характеризующихся низким уровнем экспрессии костимулирующих молекул и молекул антигенного представления (МНС) (табл. 1).

Степень дифференцировки и зрелости DC, генерированных из клеток костного мозга мышей, определяли по изменению уровня экспрессии дифференцировочных молекул CD34, CD38, CD80, CD86, CD83, CD14, МНС I/II через 3 суток после добавления к незрелым DC ЭБСП (ВЭ и ФР) (табл. 1).

ЭБСП, наряду с классическим индуктором $TNF\alpha$, вызывали снижение численности незрелых (CD34) DC. Это свидетельствует о том, что исследуемые препараты снижают численность недифференцированных клеток.

По мере созревания в культуре DC с ЭБСП снижалось содержание CD14-экспрессирующих клеток ($p < 0,05$). Наличие CD14-экспрессирующих клеток предполагает присутствие в культуре также определенного пула клеток миеломоноцитарной линии дифференцировки.

Исследуемые препараты приводили к увеличению численности клеток с маркером CD38. Причем ФР в большей степени по сравнению с ВЭ увеличивала численность клеток с молекулой адгезии CD38 (табл. 2, 3).

После стимуляции ЭБСП незрелых DC они приобретали фенотип, характерный для активированных зрелых DC с высокой экспрессией активационного маркера МНС II, необходимого для осуществления презентации антигенов. Под воздействием ЭБСП также повышалась численность DC с костимулирующими молекулами CD80 и CD86.

Исследуемые препараты индуцировали дифференцировку DC, так как обладали способностью стимулировать их созревание. На DC

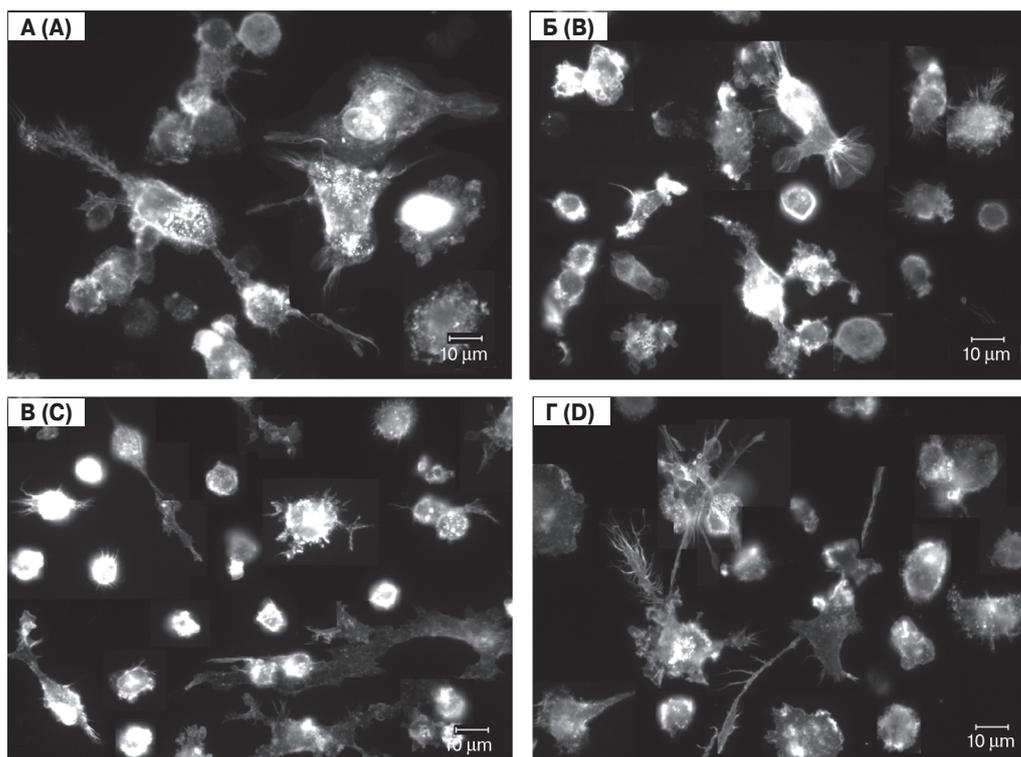


Рисунок. Дендритные клетки, генерированные из клеток-предшественников костного мозга мышей СВА, в культуре на 9 сутки (3 сутки после обработки ЭБСП)

Figure. Dendritic cells generated from CBA mouse bone marrow progenitor cells, in day 9-cell culture (3 days after treatment with experimental protein-containing preparations)

Примечания. А — незрелые DC; Б — созревшие под воздействием $TNF\alpha$ (20 нг/мл); В — ЭБСП ВЭ (50 мкл/мл); Г — ЭБСП ФР (50 мкл/мл). Микрофотография дендритных клеток при флуоресцентной микроскопии и стеклов с адгезированными DC, ок. $\times 10$, об. $\times 40$ (поскольку фотографии представлены в черно-белом варианте, на рисунке не приведены используемые фильтры; см. «Материалы и методы»).

Notes. A — immature DC; B — maturation triggered by $TNF\alpha$ (20 ng/ml); C — aqueous extraction (50 μ l/ml); D — fraction (50 μ l/ml). Microimaging of adhered dendritic cells by fluorescence microscopy, $\times 10$ ocular, $\times 40$ objective.

возрастала экспрессия маркера терминальной дифференцировки CD83 (табл. 2). При этом существенной разницы в активации CD83⁺ клеток под воздействием данных препаратов и TNF α не наблюдалось (табл. 3). Введение исследуемых пневмококковых препаратов в культуру незре-

лых DC приводило к увеличению численности популяции CD11⁺ миелоидных DC (табл. 2).

Незрелые DC в большей степени экспрессировали на своей поверхности TLR2 (54,86%). По мере созревания под воздействием исследуемых препаратов снижалась численность клеток

Таблица 1. Влияние экспериментальных белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* на созревание дендритных клеток *in vitro*

Table 1. The effect of experimental protein-containing preparations *S. pneumoniae* on the maturation of dendritic cells *in vitro*

Маркеры Markers	Количество клеток, %; M \pm SD; Me (Q1–Q3) The number of cells, %; M \pm SD; Me (Q1–Q3)			
	ВЭ Aqueous extraction	ФП (30–100 kDa) Fraction (30–100 kDa)	TNF α	Незрелые DC Immature DC
CD34 ⁺	23,9 \pm 1,4 24,2 (22,4–25,3) *	25,5 \pm 0,7 25,8 (24,7–26) *	17,36 \pm 1,35 18,8 (16,1–18,8) *	42,9 \pm 1,96 45 (41,1–45)
CD14 ⁺	43,47 \pm 0,8 43,9 (42,5–44) *	44,56 \pm 1,26 44,8 (43,2–45,7) *	37,6 \pm 3,19 38,7 (34–40,1) *	58,23 \pm 3,32 57 (55,7–62)
CD38 ⁺	35,76 \pm 2,16 36 (33,5–37,8) *	44,86 \pm 1,48 44,5 (43,6–46,5) *	45 \pm 3 45,1 (42–48) *	12,4 \pm 0,87 12,8 (11,4–13)
CD38 ⁺ /MHC II ⁺	19,5 \pm 1,11 19,7 (18,3–20,5) *	21,36 \pm 1,05 21,2 (20,4–22,5) *	24,5 \pm 1 24,4 (23,5–25,6) *	12,43 \pm 2,01 13 (10,2–14,1)
MHC II ⁺	24,43 \pm 0,51 24,3 (24–25) *	24,5 \pm 0,65 24,4 (23,9–25,2) *	38,8 \pm 1,05 38,7 (37,8–39,9) *	11,5 \pm 1,6 11 (10,2–13,3)
CD11c ⁻ /CD123 ⁺	23,3 \pm 1,21 23,5 (22–24,4) *	19,33 \pm 1,26 19,5 (18–20,5) *	36,9 \pm 1,6 17,2 (16,1–18,8) *	12,5 \pm 2,13 42,7 (41,1–45)
CD80 ⁺	43,36 \pm 0,81 43 (42,8–44,3) *	38,33 \pm 1,26 38,2 (36,7–40,1) *	66,43 \pm 2,4 66,3 (64,1–68,9) *	29,53 \pm 2,11 29,8 (27,3–31,5)
CD11c ⁺	55,5 \pm 1,6 55,7 (53,8–57) *	52 \pm 1,7 52,7 (50,5–53) *	56,96 \pm 1,45 57,6 (55,3–58) *	20,56 \pm 1,29 20,2 (19,5–22)
CD86 ⁺ /CD11c ⁺	29,16 \pm 0,76 29 (28,5–30) *	25,2 \pm 1,05 25,6 (24–26) *	34,9 \pm 0,65 35 (34,3–35,6) *	14,4 \pm 0,9 14,4 (13,5–15,3)
CD86 ⁺	40,56 \pm 1,15 40,4 (39,5–41,8) *	45,8 \pm 0,9 45,8 (44,9–46,7) *	63,86 \pm 3,85 63,7 (60,1–67,8) *	13,7 \pm 2,16 13,4 (11,7–16)
CD83 ⁺ /CD80 ⁺	33,76 \pm 1,15 33,6 (32,7–35) *	37,36 \pm 1,72 37,7 (35,5–38,9) *	42,7 \pm 2,2 42,7 (40,5–44,9) *	8,2 \pm 1,21 8 (7,1–9,5)
MHC I ⁺	70,16 \pm 3,1 70,3 (67–73,2) *	73,43 \pm 3,45 73,2 (70,1–77) *	69,76 \pm 2,41 70,1 (67,2–72) *	45,2 \pm 2,82 45,6 (42,2–47,8)
CD83 ⁺	54,23 \pm 1,4 54,3 (52,8–55,6) *	53,56 \pm 1,4 53,3 (52,4–55) *	57,2 \pm 1,23 57,5 (55,8–58,2) *	15,73 \pm 2,05 15,2 (14–18)

Примечание. В культуру незрелых DC внесли экспериментальные белоксодержащие препараты: ВЭ и ФП (50 мкл/мл), TNF α (20 нг/мл).

*p < 0,05 — достоверность различий по сравнению с незрелыми DC (Kruskal–Wallis test).

Note. Experimental protein-containing preparations were introduced into the culture of immature DC: aqueous extraction and fraction (50 μ l/ml), TNF α (20 ng/ml). *p < 0.05 — significance of differences compared with immature DC (Kruskal–Wallis test).

с данным маркером до 23,37% — ВЭ, 36,7% — ФР, 35,7% — TNF α , причем под воздействием ВЭ отмечалось более существенное снижение численности TLR2-экспрессирующих клеток по сравнению с ФР и TNF α соответственно, $p < 0,05$.

В отношении TLR4 также отмечалась тенденция к снижению числа клеток с его экспрессией с 45,7 до 23,5% — ВЭ; до 29,8% — ФР; до 24,7% — TNF α , $p < 0,05$.

Обсуждение

Зрелость DC определяется совокупностью морфологических, иммунофенотипических и функциональных параметров [3, 6]. Судя по морфологии и иммунофенотипу клеток, генерированных из костномозговых предшественников мышей под воздействием GM-CSF и IL-4, их можно отнести к популяции незрелых DC.

Введение в культуру незрелых DC белоксодержащих пневмококковых препаратов и классического индуктора созревания — TNF α —

индуцировало дифференцировку клеток с многочисленными разветвленными цитоплазматическими отростками, которые необходимы для контактирования DC с окружающими клетками. Данная особенность DC позволяет им более эффективно презентировать антигены T-лимфоцитам, способствуя формированию адаптивного иммунитета [14].

Исследования выявили, что под воздействием изучаемых препаратов происходит дифференцировка DC, так как в культуре происходило снижение численности незрелых DC более чем в 1,6 раза. Клетки начинали экспонировать маркер адгезии CD38, необходимый для контактных взаимодействий с эндотелиальными и иммунокомпетентными клетками, активационные молекулы MHC II — важные для презентации антигенов T-лимфоцитам [10, 12, 14], а также костимуляционные молекулы CD80/CD86 — усиливающие контактные взаимодействия между клетками в процессе представления этих антигенов. Под воздействием экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов, в частности ВЭ, возрастала чис-

Таблица 2. Индекс стимуляции созревания DC под воздействием экспериментальных белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* относительно незрелых DC (отрицательный контроль)

Table 2. DC maturation stimulation index under the influence of experimental protein-containing preparations of *S. pneumoniae* relative to immature DC (negative control)

Маркеры Markers	Индекс стимуляции относительно незрелых DC The stimulation index relatively immature DC		
	ВЭ Aqueous extraction	ФР (30–100 kDa) Fraction (30–100 kDa)	TNF α
CD34 ⁺	1,79**	1,68**	2,47**
CD14 ⁺	1,3**	1,3**	1,55**
CD38 ⁺	2,88*	3,6*	3,6*
CD38 ⁺ /MHC II ⁺	1,57*	1,72*	1,97*
MHC II ⁺	2,12*	2,13*	3,37*
CD11c ⁻ /CD123 ⁺	1,86*	1,54*	2,95*
CD80 ⁺	1,47*	1,29*	2,25*
CD11c ⁺	2,7*	2,53*	2,77*
CD86 ⁺ /CD11c ⁺	2*	1,75*	2,42*
CD86 ⁺	2,9*	3,34*	4,66*
CD83 ⁺ /CD80 ⁺	4,1*	4,55*	5,2*
MHC I ⁺	1,55*	1,62*	1,54*
CD83 ⁺	3,44*	3,4*	3,36*

Примечание. * — повышение/** — снижение индекса стимуляции клеток по сравнению с незрелыми DC ($p < 0,05$).

Note. * — increase/** — decrease in cell stimulation index compared with immature DC ($p < 0,05$).

Таблица 3. Индекс стимуляции DC под воздействием экспериментальных белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* по сравнению с классическим индуктором созревания TNF α (положительный контроль)

Table 3. DC stimulation index under the influence of experimental protein-containing preparations *S. pneumoniae* compared with the classical inducer of maturation of TNF α (positive control)

Маркеры Markers	Индекс стимуляции относительно TNF α The stimulation index relatively TNF α		
	ВЭ Aqueous extraction	ФР (30–100 kDa) Fraction (30–100 kDa)	Незрелые DC Immature DC
CD34 ⁺	1,37*	1,47*	2,47**
CD14 ⁺	1,15*	1,18*	1,55**
CD38 ⁺	1,25**	1	3,6*
CD38 ⁺ /MHC II ⁺	1,25**	1,14**	1,97**
MHC II ⁺	1,58**	1,58**	3,37**
CD11c ⁻ /CD123 ⁺	1,58**	1,9**	2,95**
CD80 ⁺	1,53**	1,73**	2,25**
CD11c ⁺	1	1	2,77**
CD86 ⁺ /CD11c ⁺	1,2**	1,38**	2,42**
CD86 ⁺	1,57**	1,39**	4,66**
CD83 ⁺ /CD80 ⁺	1,26**	1,14**	5,2**
MHC I ⁺	1	1,05	1,54**
CD83 ⁺	1,05	1,06	3,36**

Примечание. * — повышение/** — снижение индекса стимуляции клеток по сравнению с действием TNF α ($p < 0,05$).

Note. * — increase/** — decrease in cell stimulation index compared with the action of TNF α ($p < 0,05$).

ленность CD80-экспрессирующих лимфоцитов в 1,47 раз и CD86 — почти в 3 раза, а ФР увеличивала популяцию CD80 в 1,3 раза и CD86 — в 3,34 раза, что также может свидетельствовать о процессе дифференцировки дендритных клеток в сторону зрелых. Кроме перечисленных маркеров, показателем зрелости DC является молекула терминальной дифференцировки CD83, экспрессирующаяся только на высокодифференцированных клетках. Культура DC без добавления индуктора созревания содержала клеточные типы с экспрессией данного маркера в 15,73% случаев, и это позволяет сделать предположение, что происходила несущественная спонтанная активация клеток, в результате чего они частично созревали. Внесение в культуру незрелых DC экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов увеличивало число созревших клеток до 53% и более. При этом активность исследуемых препаратов по влиянию на созревание клеток была сопоставимой. Для ФР было характерно повышение численности клеток с молекулами адгезии (в 1,25 раза, $p < 0,05$) по сравнению с ВЭ, а ВЭ стимулировал нарастание количества DC с экспрессией костимулирующих молекул более чем в 1,12 раза в сравнении с ФР, $p < 0,05$. Возможно, что эти компенсаторные механизмы и сравняли их способность индуцировать созревание DC.

Важным этапом иммунного распознавания является наличие тех или иных паттерн-распознающих рецепторов (PRRs), которые передают сигналы, активирующие ядерные транскрипционные факторы с высвобождением спектра про-

воспалительных цитокинов, которые запускают каскад иммунных реакций с формированием адаптивного иммунитета [9, 13, 15]. В распознавании микробных антигенов ключевую роль играют Toll-подобные рецепторы (TLRs), выявляющие патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMPs) как живых микробных клеток, так и их компонентов (антигены, вакцины) [8, 9].

Больше половины незрелых DC экспрессировали на своей поверхности TLR2 и около 46% — TLR4. Введение в культуру незрелых DC ЭБСП индуцировало снижение численности клеток с данными распознающими рецепторами почти в 1,5–2 раза. Возможно, этот феномен обусловлен тем, что по мере созревания у дендритных клеток снижается необходимость распознавания лигандов, но повышается способность к антигенной презентации поглощенного и процессированного ими антигена.

Таким образом, наши исследования показали возможность получения из костномозговых предшественников мышей как зрелых DC, так и клеток миеломоноцитарного ряда при использовании в качестве индуктора созревания DC экспериментальных белоксодержащих препаратов пневмококка.

Получение вакцин на основе DC для адаптивной иммунотерапии может быть перспективным направлением в профилактике и терапии инфекционных заболеваний, а также может служить критерием оценки эффективности разрабатываемой вакцины против пневмококковой инфекции.

Список литературы/References

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. М.: Практическая медицина, 2008. 256 с. [Akhmatova N.K., Kiselevsky M.V. Innate immunity: antitumor and anti-infective. Moscow: Practical medicine, 2008. 256 p. (In Russ.)]
2. Aandahl E.M., Michaelsson J., Moretto W.J., Hecht F.M., Nixon D.F. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, pp. 2454–2459. doi: 10.1128/JVI.78.5.2454-2459.2004
3. Boor P.P.C., Bosma B.M., Tran K.T.C., van der Laan L.J.W., Hagenaaars H., IJzermans J.N.M., Metselaar H.J., Kwekkeboom J. Characterization of antigen-presenting cell subsets in human liver-draining lymph nodes. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 14, no. 10: 441. doi: 10.3389/fimmu.2019.00441
4. Castell-Rodríguez A., Piñón-Zárate G., Herrera-Enríquez M., Jarquín-Yáñez K., Medina-Solares I. Dendritic cells: location, function, and clinical implications. In: *Biology of Myelomonocytic Cells*, ed. A. Ghosh. 2017. doi: 10.5772/63122
5. Chow K., Lew M., Sutherland R., Zhan Y. Monocyte-derived dendritic cells promote Th polarization, whereas conventional dendritic cells promote Th proliferation. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, no. 2, pp. 624–636. doi: 10.4049/jimmunol.1501202
6. Dalod M., Chelbi R., Malissen B., Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.*, 2014, vol. 33, no. 10, pp. 1104–1116 doi: 10.1002/embj.201488027
7. Doherty M.T., Arditi M. TB, or not TB: that is the question — does TLR signaling hold the answer? *Clin. Invest.*, 2004, vol. 114, no. 12, pp. 1699–1703. doi: 10.1172/JCI23867
8. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunol.*, 2016, vol. 5, no. 5: e85. doi: 10.1038/cti.2016.22
9. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol.*, 2010, vol. 11, pp. 373–384. doi: 10.1038/ni.1863
10. Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein A.L., Ortolan E., Vaisitti T., Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.*, 2008, vol. 88, no. 3, pp. 841–886. doi: 10.1152/physrev.00035.2007

11. Mastelic-Gavillet B., Balint K., Boudousquie C., Gannon P.O., Kandalaf L.E. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 11, no. 10: 766. doi: 10.3389/fimmu.2019.00766
12. Paul W.E. Fundamental Immunology, 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1603 p.
13. Satoh T., Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 6, pp. 447–453. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016
14. Schetters S.T.T., Jong W.S.P., Horrevorts S.K., Kruijssen L.J.W., Engels S., Stolk D., Daleke-Schermerhorn M.H., Garcia-Vallejo J., Houben D., Unger W.W.J., den Haan J.M.M., Luirink J., van Kooyk Y. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8⁺ T cells. *Acta Biomater.*, 2019, vol. 91, pp. 248–257. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.033
15. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, no. 6, pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
16. Zhang J., Supakorndej T., Krambs J.R., Rao M., Abou-Ezzi G., Ye R.Y., Li S., Trinkaus K., Link D.C. Bone marrow dendritic cells regulate hematopoietic stem/progenitor cell trafficking. *J. Clin. Invest.*, 2019, vol. 129, no. 7, pp. 2920–2931. doi: 10.1172/JCI124829

Авторы:

Ахматова Н.К., д.м.н., зав. лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Грубер И.М., д.м.н., профессор, зав. лабораторией экспериментальной микробиологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Кукина О.М., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Макаренкова И.Д., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии, ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;
Ахматова Э.А., лаборант лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Столпникова В.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Калининченко Е.О., младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Бишева И.А., младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Сходова С.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Akhmatova N.K., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Gruber I.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Experimental Microbiology, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kukina O.M., Junior Researcher, Laboratory of Experimental Microbiology, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Makarenkova I.D., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Immunology, G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;
Akhmatova E.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Stolpnikova V.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kalinichenko E.O., Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Bisheva I.A., Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Skhodova S.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.06.2019
 Отправлена на доработку 18.12.2019
 Принята к печати 15.01.2020

Received 04.06.2019
 Revision received 18.12.2019
 Accepted 15.01.2020

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТОВ ФРАКЦИЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ENSIFER MELILOTI* НА ПАРЕНХИМАТОЗНЫЕ ОРГАНЫ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ВТОРИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ

А.Р. Мавзютов¹, Л.Р. Глазутдинова¹, Д.В. Саньчиков¹, В.С. Щекин¹,
Р.Р. Гарафутдинов², А.В. Чижова¹, А.Р. Габдрахманова³

¹ Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия

³ ГБУЗ МЗ РБ Городская клиническая больница № 13, г. Уфа, Россия

Резюме. *Введение.* Липополисахариды грамотрицательных бактерий (ЛПС) более известны как бактериальные эндотоксины. Однако в специальной литературе все больше данных о целом ряде физиологических эффектов ЛПС, наблюдаемых и в норме. В частности, показана иммуномодулирующая активность ЛПС некоторых видов бактерий. Цель исследования — характеристика физиологических эффектов липополисахаридов *Ensifer meliloti* при индуцированном иммунодефиците у крыс в эксперименте. *Материалы и методы.* На 60 беспородных крысах-самцах, у которых индуцировали иммунодефицитное состояние при внутрибрюшинном введении цитостатика — циклофосамида, исследована биологическая активность фракций ЛПС *E. meliloti*. Исследуемые фракции ЛПС *E. meliloti* вводили внутрибрюшинно через 24 часа после инъекции ЦФ в течение 21 дня. На 22-е сутки эксперимента лабораторные животные подвергались эвтаназии и аутопсии с последующим морфометрическим исследованием внутренних органов. В дальнейшем парафиновые срезы паренхиматозных органов окрашивались гематоксилин-эозином и исследовались гистологически посредством световой микроскопии. *Результаты.* Установлено, что при введении циклофосамида лабораторным животным по окончании периода наблюдения имело место незначительное снижение массы печени и почек; вес сердца и селезенки оставался неизменным (в сравнении с интактными животными). Однако указанные изменения были статистически не значимы. Статистически достоверно у иммунодефицитных крыс в сравнении с животными контрольной группы увеличивался лишь вес легких. При внутрибрюшинном введении фракций ЛПС на фоне вторичного иммунодефицита изменяются весовые характеристики наиболее интенсивно кровоснабжаемых органов (печень и почки), что указывает на системный характер их эффектов. В селезенке отмечено характерное увеличение количества фолликулов с крупными герминативными центрами, а также вторичных фолликулов стромы органа с образованием лимфоидных муфт; в печени — лимфоидная инфильтрация в портальных трактах и восстановление до нормы сосудистого рисунка; в легких при введении ЛПС и «Ликопада» — выраженная

Адрес для переписки:

Мавзютов Айрат Радикович
450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, 96/98
ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 (347) 276-19-60.
E-mail: ufalab@mail.ru

Contacts:

Ayrat R. Mavzyutov
450008, Russian Federation, Ufa, Lenin str., 96/98,
Bashkir State Medical University.
Phone: +7 (347) 276-19-60.
E-mail: ufalab@mail.ru

Для цитирования:

Мавзютов А.Р., Глазутдинова Л.Р., Саньчиков Д.В., Щекин В.С.,
Гарафутдинов Р.Р., Чижова А.В., Габдрахманова А.Р. Морфометрическая
характеристика эффектов фракций липополисахарида *Ensifer meliloti*
на паренхиматозные органы лабораторных крыс с вторичным
иммунодефицитом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 93–100.
doi: 10.15789/2220-7619-MCO-1242

Citation:

Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shchekin V.S.,
Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R. Morphometric
characteristics of effects induced by *Ensifer meliloti* lipopolysaccharide
fractions on parenchymatous organs in laboratory rats with secondary
immunodeficiency // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 93–100. doi: 10.15789/2220-
7619-MCO-1242

гиперплазия лимфоидной ткани с крупными герминативными центрами. *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные фракции ЛПС *E. meliloti* при вторичном иммунодефиците у крыс вызывают положительные изменения иммунореактивности.

Ключевые слова: липополисахариды, *E. meliloti*, крысы, вторичный иммунодефицит, «Ликопид», гистология.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF EFFECTS INDUCED BY *ENSIFER MELILOTI* LIPOPOLYSACCHARIDE FRACTIONS ON PARENCHYMATOUS ORGANS IN LABORATORY RATS WITH SECONDARY IMMUNODEFICIENCY

Mavzyutov A.R.^a, Glazutdinova L.R.^a, Sanchokov D.V.^a, Shchekin V.S.^a, Garafutdinov R.R.^b, Chizhova A.V.^a, Gabdrakhmanova A.R.^c

^a Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

^b Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russian Federation

^c City Clinical Hospital No. 13, Ufa, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Gram-negative bacteria-derived lipopolysaccharides (LPS) are better known as bacterial endotoxins. However, an increasing body of evidence has been accumulated regarding a whole range of LPS-bound physiological effects also observed in normal settings. In particular, LPS derived from some bacterial species was shown to exhibit an immunomodulating activity. Study objective — to characterize physiological effects of *Ensifer meliloti* lipopolysaccharides in modelled rat induced immunodeficiency. *Materials and methods.* Biological activity of intraperitoneally administered *E. meliloti* LPS fractions was studied for 21 days in 60 outbred male rats after induction of a minimal immunodeficiency state 24 hours later after inoculating cytostatic agent cyclophosphamide (CF). Animals were euthanized on day 22 followed by conducting an autopsy and morphometric study of internal organs. Later, paraffin-embedded sections of parenchymal organs were stained with hematoxylin-eosin and examined histologically by light microscopy. *Results.* It was found that at the end of the experiment cyclophosphamide applied to laboratory animals insignificantly decreased weight of liver and kidney, but not that of heart and spleen (compared to intact animals). In contrast, lung weight was solely significantly increased in immunodeficient rats compared to control. Intraperitoneally administered LPS fractions during secondary immunodeficiency affected weight parameters in the liver and kidney as the most intensively blood supplied organs suggesting its systemic effects. Quantity of follicles with large germinal centers as well as secondary follicles and lymphatic sheath formation in splenic stroma was increased that features activated immune response. Moreover, hepatic lymphoid infiltration in the portal tracts and reversal to normal vascular pattern were found as well. In contrast, LPS and Licopid administered to rats resulted in marked lung hyperplasia of lymphoid tissue containing large germinal centers. *Conclusion.* The data obtained indicate that *E. meliloti*-derived LPS fractions administered to rats with secondary immunodeficiency positively affected immunoreactivity.

Key words: LPS, *E. meliloti*, rats, secondary immunodeficiency, Licopid, histology.

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем медицины остается сепсис [1], этиологию которого в 60–70% случаев связывают с микроорганизмами [2, 3]. В качестве основного индуктора системных воспалительных реакций при этом рассматривается участие липополисахарида клеточной стенки (ЛПС) грамотрицательных бактерий, взаимодействующего с Toll-подобными рецепторами типа 4 (TLR-4), что впоследствии приводит к развитию сверхсильного иммунного ответа [4]. В частности, ЛПС рассматривается в качестве одного из основных факторов вирулентности *Yersinia pestis* и патогенных вариантов *Yersinia pseudotuberculosis* [5, 6, 7].

На молекулярном уровне участие и негативные эффекты ЛПС достаточно хорошо охарактеризованы при различных патологических состояниях, как у человека, так и у лабораторных животных [8, 9, 10, 11]. При этом установлено, что системная эндотоксинемия имеет место и в норме. Так, например, физиологическая концен-

трация ЛПС в кровотоке составляет 3–10 пкг/мл [12], и при таких небольших концентрациях ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий обладает иммуномодулирующей активностью [13, 14]. Более того, установлено, что ЛПС-опосредованная активация TLR-4 может сопровождаться положительным пролиферативным влиянием на стволовые клетки нервной системы, способствуя их дифференцировке и повышая выживаемость, например, иммунодефицитных крыс и мышей [15].

В исследовании Vincent J.L. и соавт. была продемонстрирована возможность препаративного выделения фракций ЛПС *Escherichia coli* [16]. В этой связи определенным научным интересом представляет оценка биологической активности фракций ЛПС, выделенных из непатогенных для человека грамотрицательных бактерий, относящихся к виду *Ensifer meliloti* и являющихся естественными азотфиксирующими симбионтами бобовых растений [17].

Цель исследования — характеристика физиологических эффектов ЛПС *E. meliloti* на орган-

ном и тканевом уровне в эксперименте на лабораторных крысах с индуцированным иммунодефицитом для экспериментальной оценки иммуномодулирующих перспектив липополисахаридов грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы

Для выделения и исследования биологической активности липополисахарида использовали культуру *E. meliloti*, штамм Л-14 из коллекции микроорганизмов «Симбионт» (Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа), выделенный из клубеньков люцерны посевной. Чистую культуру *E. meliloti* наращивали в чашках Петри на твердой питательной среде УМ при 28°C до завершения экспоненциальной фазы роста. Для выделения липополисахаридов использовали описанный нами ранее способ, заключающийся в получении ЛПС с помощью жидкостной колоночной хроматографии в модификации, исключавшей этап фенольной экстракции ЛПС из биомассы. Принадлежность полученных в ходе выделения веществ к ЛПС была подтверждена спектроскопией ЯМР ¹H [16].

Исследование биологической активности фракций ЛПС *E. meliloti* проводили на 60 беспородных крысах-самцах (231±27 г) из уфимского питомника (страна происхождения — Польша). Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России с естественным световым режимом, на стандартном рационе питания, со свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением приказа № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на 6 групп (n = 10) для каждого эксперимента случайным образом, с использованием в качестве критерия массы тела (табл. 1).

Иммунодефицитное состояние лабораторных животных индуцировали с помощью цитостатика — циклофосфамида (ЦФ) в форме лекарственного препарата «Эндоксан» (Вахтер, США) в дозе 50 мг/кг, за 24 ч до введения образцов исследуемого биологического материала.

Исследуемые фракции ЛПС *E. meliloti* вводили внутрибрюшинно через 24 ч после инъекции ЦФ и предварительного разведения в физиологическом растворе — ежедневно в течение 21 дня в физиологической для крыс дозе 0,1 мг/кг. Препаратом сравнения для оценки иммуномодулирующей активности служил «Ликопид» (ЗАО «Пептек», Россия) в терапевтической дозе в 0,2 мг/кг.

На 22-е сутки лабораторные животные выводились из эксперимента посредством эвтаназии в эксикаторе передозировкой диэтилового эфира для наркоза, после чего каждую крысу подвергали аутопсии с последующим морфометрическим исследованием органов. В дальнейшем парафиновые срезы паренхиматозных органов окрашивались гематоксилин-эозином и исследовались гистологически посредством световой микроскопии.

Для статистической обработки данных применялись непараметрические методы, для описания количественных признаков в малых выборках — медиана (Me) и интерквартильный размах (Q1–Q3), для расчета статистической значимости различий количественных признаков между группами — непараметрический критерий Манна–Уитни для двух независимых групп. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Из *Ensifer meliloti* было получено 3 фракции ЛПС — ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3, принадлежность которых к липополисахаридам была подтверждена спектроскопией ЯМР ¹H. Спектр одной из фракций показан на рис. 1.

Все 3 фракции выходили из колонки на этапе элюции смесью этанол–триэтиламин, хорошо растворялись в воде и имели спектры ЯМР ¹H, идентичные по сигналам, но различавшиеся по интегральной интенсивности пиков. Последнее могло быть обусловлено различной степенью редукции олигосахаридной части молекулы ЛПС. Наименее редуцированной по углеводному фрагменту являлась фракция ЛПС-2, однако для дальнейшей работы были взяты все три фракции ЛПС.

Морфометрическая характеристика

Установлено, что при введении циклофосфамида лабораторным животным по окончании периода наблюдения имело место незначительное снижение массы печени и почек; вес сердца и селезенки оставался неизменным (в сравнении с интактными животными). Однако указанные изменения были статистически не значимы. Статистически достоверно у иммунодефицитных крыс в сравнении с показателями контрольной группы увеличивался лишь вес легких (табл. 2).

Намного более выраженные изменения весовых характеристик внутренних органов имели место при введении иммунодефицитным крысам исследуемых фракций ЛПС и препарата сравнения («Ликопид»). Так, введение ЛПС-2, ЛПС-3 или «Ликопида» сопровождалось достоверным и сопоставимым увеличением мас-

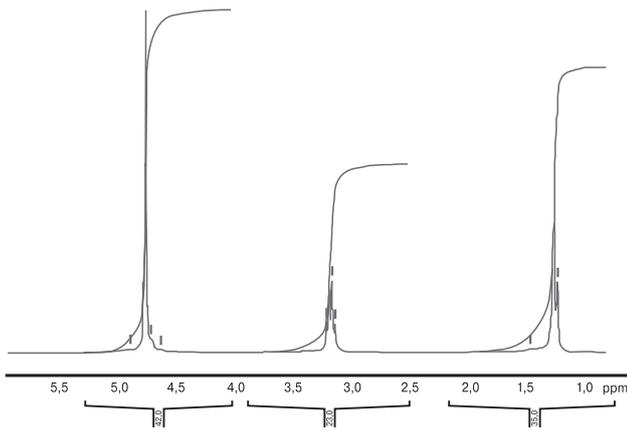


Рисунок 1. Спектр ЯМР ^1H фракции ЛПС-3 *E. meliloti*

Figure 1. NMR spectrum ^1H of *E. meliloti* LPS-3 fraction

Примечание. В полученном спектре наблюдались характерные сигналы протонов жирнокислотных остатков при 1,3 м.д. (группа протонов I), CH_2 -групп, сопряженных с полярными фрагментами, при 3,2 м.д. (группа протонов II) и протонов углеводных остатков при 4,8 м.д. (группа протонов III).

Note. The spectrum obtained, demonstrated characteristic signals of fatty acid residues protons were observed at 1.3 ppm. (group of protons I), CH_2 -groups conjugated with polar fragments, at 3.2 ppm (group of protons II) and protons of carbohydrate residues at 4.8 ppm (group of protons III).

сы и печени и почек до их нормальных значений, наблюдавшихся у интактных животных (табл. 2).

Вес легких за период наблюдения не восстанавливался до нормальных значений и был сопоставим с массой этого органа в группе животных с индуцированным иммунодефицитом (табл. 2).

Вес селезенки оставался неизменным и достоверно не менялся как в группе интактных животных, так и в группах сравнения (табл. 2).

Масса сердца достоверно увеличилась только в группе животных с иммунодефицитом, которым вводился «Ликопид», тогда как у интактных, иммунодефицитных без коррекции (группа 2) и иммунодефицитных животных, которым вводили все исследованные фракции ЛПС или «Ликопид», вес сердца оставался без значимого изменения (табл. 2).

Намного более существенные реактивные изменения были обнаружены при гистологическом исследовании паренхиматозных органов иммунодефицитных животных.

Гистологическая характеристика

Селезенка. В контрольной группе рисунок органа был сохранен. Так, ткань селезенки была представлена крупными фолликулами с умеренным количеством лимфоидных муфт и полнокровием красной пульпы, что соответствовало норме. В группе животных с индуцированным

иммунодефицитом отмечалось подавление лимфоидной ткани с редукцией фолликулов за счет мантийной зоны, атрофией лимфоидных муфт в строме органа и отсутствием герминативных центров. При введении иммунодефицитным животным «Ликопид» морфологически формировалось состояние умеренной гиперплазии фолликулов селезенки с увеличением количества герминативных центров и вторичных фолликулов (рис. 2, II обложка).

При введении животным отдельных фракций ЛПС на фоне иммунодефицита существенных различий между фракциями не было. Однако в целом при введении ЛПС в сравнении с «Ликопидом» увеличение количества фолликулов селезенки с крупными герминативными центрами, расширением мантийной зоны, увеличением вторичных фолликулов и появлением лимфоидных муфт в строме органа было более выраженным. Это свидетельствует о том, что при введении ЛПС на фоне иммунодефицита в селезенке имеет место лимфоидная гиперплазия и активируется иммунный ответ (рис. 2, II обложка).

Печень. Ткань печени в контрольной группе животных была сохранена. Центральные вены долек малокровные, в портальных трактах обнаруживалась незначительная лимфоидная инфильтрация. В печени интактных животных с иммунодефицитом гистологически отмечена выраженная лимфоидная инфильтрация в портальных трактах. Аналогичная гистологическая картина имела место и в группе иммунодефицитных животных, которым вводили «Ликопид», характеризовавшаяся полнокровием сосудов и отеком стромы. В отличие от вышеуказанного в группе животных с индуцированным иммунодефицитом при введении ЛПС лимфоидная инфильтрация в портальных трактах была незначительной, сосуды были малокровными, что приближает подобную картину к норме, наблюдавшейся в контрольной группе (рис. 3, III обложка).

Легкие. В легких животных контрольной группы отмечается лимфоидная перибронхиальная и периваскулярная инфильтрация легочной ткани, в большей степени обусловленная воздействием эфира для вывода животных из эксперимента. В группе интактных иммунодефицитных животных, напротив, гистологически имело место подавление и уменьшение лимфоидной ткани, характеризовавшееся отсутствием лимфоидных муфт. В противоположность этому в группе, получавшей «Ликопид», обнаруживалось полнокровие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки, а также умеренная гиперплазия лимфоидной ткани. В группе иммунодефицитных животных, которым вводили ЛПС, имело место полнокро-

Таблица 1. Описание экспериментальных групп

Table 1. Description of experimental groups

Номер группы Group number	Обозначение Name of groups	Описание Description
Группа 1 Group 1	Интактная группа Intact group	Ничего не вводили No injections
Группа 2 Group 2	Контрольная группа Control group	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили воду Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of water injection
Группа 3 Group 3	ЛПС <i>Ensifer meliloti</i>, фракция 1 LPS <i>Ensifer meliloti</i> , fraction No. 1	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили ЛПС <i>Ensifer meliloti</i>, фракция 1 Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of/LPS <i>Ensifer meliloti</i> fraction No. 1 injection
Группа 4 Group 4	ЛПС <i>Ensifer meliloti</i>, фракция 2 LPS <i>Ensifer meliloti</i> , fraction No. 2	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили ЛПС <i>Ensifer meliloti</i>, фракция 2 Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of/LPS <i>Ensifer meliloti</i> fraction No. 2 injection
Группа 5 Group 5	ЛПС <i>Ensifer meliloti</i>, фракция 3 LPS <i>Ensifer meliloti</i> , fraction No. 3	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили ЛПС <i>Ensifer meliloti</i>, фракция 3 Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of/LPS <i>Ensifer meliloti</i> fraction No. 3 injection
Группа 6 Group 6	«Ликопид» Licopid	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили «Ликопид» Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of Licopid injection

вие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки, как и при введении «Ликопида». Однако наряду с этим была обнаружена гиперплазия лимфоидной ткани с крупными герминативными центрами, что говорит об активации иммунного ответа (рис. 4, III обложка).

Обсуждение

Сепсис-индуцирующие эффекты ЛПС к настоящему моменту достаточно полно охарактеризованы [1, 2, 3, 4]. Однако, учитывая, что источником ЛПС является большое количество представителей грамотрицательной микробиоты, сопровождающей человека на протяжении всей его жизни и не вызывающей при этом септических состояний [12], представляется логичным предположение о существовании предшествующих этапов, на которых ЛПС может оказывать отличающиеся по силе и характеру биологические эффекты. Их регистрация даже в эксперименте при введении ЛПС в критичных, приводящих к системному воспалительному ответу условиях проблематична. В связи с этим первым постулатом, исходя из которого планировалось данное исследование, стало изучение не цельных препаратов бактериальных липополисахаридов, а их отдельных фракций.

Вторым постулатом, на котором выстраивалась логика исследования, было понимание быстротечности, силы и многообразия эффектов ЛПС при развитии сепсиса в силу их цитокин-

опосредованного механизма, что практически исключало возможность регистрации досептических эффектов физиологических концентраций ЛПС или их фракций. Указанное послужило основанием для рассмотрения связей между эффектами исследуемых соединений и морфологическими изменениями органов, которые при сепсисе становятся основной ареной системного воспалительного ответа и одновременно отличаются большей стабильностью.

В результате проведенных исследований показано, что при внутрибрюшинном введении фракций ЛПС изменения весовых характеристик преимущественно касались наиболее интенсивно кровоснабжаемых органов — печени и почек. Это указывает на системный характер их эффектов. Однако восстановление их веса до нормальных значений на фоне иммунодефицита при введении крысам исследуемых фракций ЛПС и препарата сравнения («Ликопид») может отражать их компенсаторный физиологический характер (табл. 2).

Гистологически установлено, что при внутрибрюшинном введении циклофосфамида вторичное иммунодефицитное состояние обуславливается не только снижением функциональной активности лимфоидных клеток, как было показано ранее [13], но и вполне конкретными морфологическими изменениями органов, прямо или косвенно задействованных в реализации иммунного ответа. Так, угнетение лимфоидной ткани было отмечено в селе-

Таблица 2. Влияние фракций липополисахарида *E. meliloti* на весовые характеристики паренхиматозных органов крысTable 2. Influence of *E. meliloti* lipopolysaccharide fractions on the weight characteristics in rat parenchymal organs

Показатель Measure	Группы крыс/Groups of rats					
	1 (n = 10) Интактные Intact group	2 (n = 10) Контроль без лечения Control	3 (n = 10) ЛПС-1 LPS-1	4 (n = 10) ЛПС-2 LPS-2	5 (n = 10) ЛПС-3 LPS-3	6 (n = 10) «Ликопид» Licopid
Селезенка/Spleen						
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,1±0,262 1,05/[1,0-1,3]	1,05±0,255 1,1/[0,9-1,3] p ₁₋₂ = 0,816	1,08±0,27 1,1/[0,8-1,3] p ₂₋₃ = 0,734	1,15±0,19 1,2/[0,9-1,3] p ₂₋₄ = 0,473	1,16±0,384 1,1/[0,8-1,5] p ₂₋₅ = 0,597	1,17±0,149 1,2/[1,1-1,3] p ₂₋₆ = 0,406
Печень/Liver						
M±σ Me/[Q1-Q3]	9,1±1,179 9,55/[8,0-10,1]	7,95±1,58 7,5/[7,2-9,4] p ₁₋₂ = 0,088	9,25±1,869 9,05/[8,3-9,5] p ₂₋₃ = 0,226	10,21±1,371 9,8/[9,7-10,0] p ₂₋₄ = 0,004	9,88±1,734 9,7/[8,8-10,7] p ₂₋₅ = 0,026	9,67±1,164 9,85/[8,7-10,4] p ₂₋₆ = 0,023
Почки/Kidney						
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,63±0,2 1,65/[1,5-1,7]	1,54±0,217 1,5/[1,4-1,7] p ₁₋₂ = 0,283	1,68±0,235 1,6/[1,5-1,8] p ₂₋₃ = 0,174	1,74±0,171 1,75/[1,7-1,8] p ₂₋₄ = 0,026	1,77±0,231 1,8/[1,5-1,9] p ₂₋₅ = 0,045	1,93±0,206 1,9/[1,8-2,1] p ₂₋₆ = 0,003
Сердце/Heart						
M±σ Me/[Q1-Q3]	0,87±0,106 0,9/[0,8-0,9]	0,91±0,099 0,9/[0,9-0,9] p ₁₋₂ = 0,231	0,87±0,142 0,8/[0,8-0,8] p ₂₋₃ = 0,212	0,84±0,126 0,8/[0,8-0,8] p ₂₋₄ = 0,104	0,99±0,202 0,95/[0,8-1,2] p ₂₋₅ = 0,496	1,05±0,158 1,0/[0,9-1,1] p ₂₋₆ = 0,038
Легкие/Lungs						
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,96±0,303 1,85/[1,7-2,1]	2,29±0,415 2,2/[2,0-2,5] p ₁₋₂ = 0,047	2,210±0,57 2,15/[1,9-2,5] p ₂₋₃ = 0,571	2,07±0,291 2,0/[1,8-2,2] p ₂₋₄ = 0,212	2,44±0,465 2,35/[2,3-2,8] p ₂₋₅ = 0,326	2,55±0,314 2,6/[2,3-2,8] p ₂₋₆ = 0,089

Примечания. Различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей: p₁₋₂ — интактной и контрольной групп;p₂₋₃ — контрольной и 3 групп; p₂₋₄ — контрольной и 4 групп; p₂₋₅ — контрольной и 5 групп; p₂₋₆ — контрольной и 6 групп.Notes. Differences are statistically significant ($p < 0.05$) while comparing parameters between: p₁₋₂ — intact and control groups; p₂₋₃ — control group and 3rd groups; p₂₋₄ — control group with 4th group; p₂₋₅ — control group and 5th group; p₂₋₆ — control group with 6th group.

зенке, печени и легких лабораторных животных, у которых при введении циклофосфида наблюдали достаточно схожие гистологические изменения.

Вместе с тем компенсаторные механизмы ответных реакций указанных паренхиматозных органов, инициируемых исследуемыми в данной работе иммунорегуляторными соединениями, имели гистологическую специфику.

Так, в селезенке морфологические изменения, связанные с введением «Ликопида» и исследуемых фракций ЛПС, были наиболее выраженными. При введении ЛПС в сравнении с «Ликопидом» имело место более значительное повышение количества фолликулов селезенки с крупными герминативными центрами и расширением мантийной зоны, увеличением вторичных фолликулов и с образованием лимфоидных муфт в строме органа, что в совокупности указывает на лимфоидную гиперплазию, наблюдаемую при активации иммунореактивности.

В печени экспериментальных животных на фоне индуцированного иммунодефицита

преимущественно отмечалось снижение интенсивности кровоснабжения и выраженная лимфоидная инфильтрация в портальных трактах. При введении «Ликопида» на фоне иммунодефицита кровоснабжение органа становилось избыточным, что сопровождалось последующим отеком стромы. Тогда как при введении ЛПС лимфоидная инфильтрация в портальных трактах была незначительной, сосуды были малокровными, что соответствовало картине, наблюдавшейся в контрольной группе.

В ткани легкого, как и в печени, при введении «Ликопида» отмечалось полнокровие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки, а также умеренная гиперплазия лимфоидной ткани. В группе иммунодефицитных животных, которым вводили ЛПС, как и при введении «Ликопида», имело место полнокровие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки. Однако наряду с этим имела место выраженная гиперплазия лимфоидной ткани с крупными герминативными центрами, что также указывало на активацию иммунного ответа.

Таким образом, представленные экспериментальные данные могут служить достаточно весомым и, что важно, воспроизводимым доказательством физиологических эффектов системной ЛПС-опосредованной эндотоксинемии, прикладные перспективы которых, на наш взгляд, очевидны.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК-Хелснет-НТИ-2017», Москва.

Список литературы/References

1. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. Вып. 93. С. 49–51. [Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteyeva I.V., Anissimov A.P. The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2007, iss. 93, pp. 49–51. (In Russ.)]
2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Анисимов А.П. Укорочение кора липополисахарида снижает вирулентность *Yersinia pestis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. Вып. 99. С. 50–51. [Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Kombarova T.I., Titareva G.M., Bakhteyeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Anisimov A.P. Truncation of lipopolysaccharide core decreases *Yersinia pestis* virulence. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2009, iss. 99, pp. 50–51. (In Russ.)]
3. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства // Acta naturae. 2012. Т. 4, № 3 (14). С. 49–61. [Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta naturae*, 2012, vol. 4, no. 3 (14), pp. 49–61. (In Russ.)]
4. Инфекции и воспаления в урологии. Под ред. Глыбочко П.В., Коган М.И., Набока Ю.Л. М.: Медфорум, 2019. 888 с. [Infections and inflammations in urology. Eds. Glybochko P.V., Kogan M.I., Naboka Yu.L. Moscow: Medforum, 2019. 888 p. (In Russ.)]
5. Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Еникеев А.Н., Бондаренко В.М. Системная эндотоксинемия как патогенетический фактор осложнения беременности // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2012. № 5. С. 16–21. [Mavzyutov A.R., Bondarenko K.R., Enikeev A.N., Bondarenko V.M. System endotoxemia as a pathogenetic factor of the complications of pregnancy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, vol. 5, pp. 16–21. (In Russ.)]
6. Мавзютов А.Р., Князева О.А., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р. Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2017. № 3. С. 84–90. [Mavzyutov A.R., Knyazeva O.A., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R. Effect of lipopolysaccharide of *Escherichia coli* on phagocyte and metabolic activity of mice blood neutrophils with induced immune deficiency. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, vol. 3, pp. 84–90. (In Russ.)]
7. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютов А.Р., Хайруллина Р.М., Акбашева А.О., Кузовкина О.З. Состояние антиэндотоксиновой защиты при внебольничной пневмонии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010. № 4. С. 65–71. [Mavzyutova G.A., Fazlyeva R.M., Mavzyutov A.R., Khairullina R.M., Kuzovkina O.Z. The state of anti-endotoxine defence in the Community acquired pneumonia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, vol. 4, pp. 65–71. (In Russ.)]
8. Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р. Выделение препаративных количеств липополисахаридов *E. coli* методом жидкостной колоночной хроматографии // Вестник Башкирского университета. 2017. Вып. 22, № 2. С. 351–355. [Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R. Preparative extraction of *E. coli* lipopolysaccharide by liquid column chromatography. *Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of Bashkir University*, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 351–355. (In Russ.)]
9. Салахов И.М., Аниховская И.А., Майский И.А., Маркелова М.М., Окорок П.Л., Хасанова Г.Р., Юркив В.А. Нормативные показатели системной эндотоксинемии как базисный элемент определения роли липополисахаридов кишечной микрофлоры в общей патологии // Патогенез. 2015. Вып. 13, № 1. С. 18–27. [Salakhov I.M., Anihovskaya I.A., Maysky I.A., Markelova M.M., Okorokov P.L., Hasanova G.R., Jurkiv V.A. The normative data of systemic endotoxemia as the basic element of role definition of lipopolysaccharides of gut organisms in general pathology. *Patogenez = Pathogenesis*, 2015, iss. 13, no. 1, pp. 18–27. (In Russ.)]
10. Aldapa-Vega G., Pastelín-Palacios R., Isibasi A., Moreno-Eutimio M.A., López-Macias C. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Rev. Alerg. Mex.*, 2016, vol. 63, no. 3, pp. 293–302. doi: 10.29262/ram.v63i3.207
11. Cohen J., Vincent J.L., Adhikari N.K., Machado F.R., Angus D.C., Calandra T., Jaton K., Giulieri S., Delaloye J., Opal S., Tracey K., van der Poll T., Pelfrene E. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 5, pp. 581–614. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70112-X
12. Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F., Calvano S.E., Remick D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. Inflammation and the host response to injury investigators. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, vol. 12, no. 1, pp. 60–67. doi: 10.1128/CDD1.12.1.60-67.2005
13. Geddes B.A., Oresnik I.J. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.*, 2014, vol. 60, no. 8, pp. 491–507. doi: 10.1139/cjm-2014-0306
14. Grasselli C., Ferrari D., Zalfa C., Soncini M., Mazzocchi G., Facchini F.A., Marongiu L., Granucci F., Copetti M., Vescovi A.L., Peri F., De Filippis L. Toll-like receptor 4 modulation influences human neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.*, 2018, vol. 9, no. 3: 280. doi: 10.1038/s41419-017-0139-8

15. Vincent J.L., Sakr Y., Sprung C.L., Ranieri V.M., Reinhart K., Gerlach H., Moreno R., Carlet J., Le Gall J.R., Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Sepsis occurrence in acutely ill patients investigators. *Crit. Care Med.*, 2006, vol. 34, no. 2, pp. 344–353. doi: 10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A
16. Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D., Moreno R., Lipman J., Gomersall C., Sakr Y., Reinhart K.; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 2009, vol. 302, no. 2, pp. 2323–2329. doi:10.1001/jama.2009.1754
17. Wiersinga W.J., van der Poll T. Sepsis: new insights into its pathogenesis and treatment. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 2010, vol. 154: A1130.

Авторы:

Мавзютов А.Р., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор кафедры лабораторной диагностики ИДПО ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;

Глазутдинова Л.Р., студентка 4 курса медико-профилактического факультета с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;

Саньчиков Д.В., студент 4 курса медико-профилактического факультета с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;

Щекин В.С., аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;

Гарафутдинов Р.Р., зав. лабораторией физико-химических методов анализа биополимеров Института биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия;

Чижова А.В., ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;

Габдрахманова А.Р., биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ Городская клиническая больница № 13, г. Уфа, Россия.

Authors:

Mavzyutov A.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Fundamental and Applied Microbiology Department, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Glazutdinova L.R., 4-year Student, Department of Preventive Medicine and Biology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Sanchokov D.V., 4-year Student, Department of Preventive Medicine and Biology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Shchekin V.S., PhD Student, Department of Pathoanatomy, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Garafutdinov R.R., Head of the Laboratory of Physical-Chemical Methods of Analysis of Biopolymers of Institute of Biochemistry and Genetics, Federal Research Center Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation;

Chizhova A.V., Assistant Professor, Department of Pathoanatomy, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Gabdrakhmanova A.R., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, City Clinical Hospital No. 13, Ufa, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.07.2019
Отправлена на доработку 26.11.2019
Принята к печати 14.03.2020

Received 05.07.2019
Revision received 26.11.2019
Accepted 14.03.2020

PHENOTYPE REMODELING IN NEUTROPHILIC GRANULOCYTE SUBSETS CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG IN *DE NOVO* EXPERIMENTAL MODEL OF VIRAL-BACTERIAL INFECTION *IN VITRO*

I.V. Nesterova^{a,b}, G.A. Chudilova^b, T.V. Rusinova^b, V.N. Pavlenko^b, Ya.A. Yutskevich^b,
N.K. Barova^b, V.A. Tarakanov^b

^aPeople's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^bKuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. A search for new targeted therapeutic strategies based on examining immunopathogenetic mechanisms for emerging co-infections is relevant and may further contribute not only to optimizing choice of immunotropic drugs, but also to achieving positive clinical and immunological remission for abnormal infectious processes. Previously, our studies found that recurrent viral-bacterial respiratory infections are associated with dysfunction of neutrophilic granulocytes (NG) with varying degree of intensity in altered effector properties. NG dysfunctions are often associated with diverse phenotypic profiles characterized by varying density for expression level of functionally significant trigger receptors. The aim of the study was to pinpoint phenotype transformation in CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocytes in experimental model of viral-bacterial infection *in vitro*. We examined 52 peripheral blood samples collected from 13 healthy adult volunteers. Viral, bacterial and virus-bacterial infection was modelled *in vitro* by incubating blood-derived cell samples with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), double-stranded RNA (dsRNA) or in combination followed by assessing changes in immunophenotyping of CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG by using MAbS CD16-ECD, CD64-FITC, CD32-PE, CD11b-PC5 conjugates (Beckman Coulter International SA, France). It was demonstrated that NGs from healthy adult volunteers were dominated by CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG as well as minor subset CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG varying in expression density of membrane molecules. Percentage of the minor subset CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG was significantly increased after exposure with dsRNA, fMLP and dsRNA+fMLP compared to untreated samples. Comparative analysis revealed that various immunotropic agents differed in affecting expression of surface receptor molecules CD16, CD32 and unidirectional effects, but of varying magnitude altering CD11b marker both in major and minor subsets. Preincubation with dsRNA followed by adding fMLP allowed to find that they co-stimulated expression of surface receptors in both NG subsets. We generated an experimental model of viral-bacterial co-infection *in vitro* by using fMLP and dsRNA and observed types of phenotype transformation in CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG subsets. This model can be used to evaluate transformation of other NG subset phenotypes, NG functional activity, features of NET formation as well as impact of various immunotropic agents on NG.

Key words: neutrophilic granulocytes, phenotype, subpopulation, coinfection, experimental model, fMLP, dsRNA.

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,
ФГАБОУ ВО Российский университет дружбы народов
Министерства образования и науки России.
Тел.: 8 (916) 187-73-41. E-mail: inesterova1@yandex.ru

Contacts:

Irina V. Nesterova
117198, Russian Federation, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6,
People's Friendship University of Russia.
Phone: +7 (916) 187-73-41. E-mail: inesterova1@yandex.ru

Для цитирования:

Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Русинова Т.В., Павленко В.Н.,
Юцкевич Я.А., Барова Н.К., Тараканов В.А. Ремоделинг фенотипа
субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG,
CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG в созданной de novo экспериментальной
модели вирусно-бактериальной инфекции в системе *in vitro* // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 101–110. doi: 10.15789/2220-7619-ROT-1517

Citation:

Nesterova I.V., Chudilova G.A., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Yutskevich Ya.A.,
Barova N.K., Tarakanov V.A. Phenotype remodeling in neutrophilic granulocyte
subsets CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG
in de novo experimental model of viral-bacterial infection *in vitro* // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1,
pp. 101–110. doi: 10.15789/2220-7619-ROT-1517

РЕМОДЕЛЛИНГ ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ В СОЗДАННОЙ DE NOVO ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В СИСТЕМЕ IN VITRO

Нестерова И.В.^{1,2}, Чудилова Г.А.², Русинова Т.В.², Павленко В.Н.², Юцкевич Я.А.², Барова Н.К.², Тараканов В.А.²

¹ФГАБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия

Резюме. Поиск новых таргетных терапевтических стратегий, базирующихся на изучении иммунопатогенетических механизмов возникновения коинфекций, является актуальным и может в дальнейшем способствовать не только оптимизации выбора иммуотропных лекарственных средств, но и достижению позитивной клинико-иммунологической ремиссии нетипично протекающих инфекционных процессов. Ранее нашими исследованиями было установлено, что возвратные вирусно-бактериальные респираторные инфекции ассоциированы дисфункциями нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с разной степенью выраженности нарушений их эффекторных свойств. Зачастую дисфункции НГ сопряжены с различными фенотипическими профилями, характеризующимися разными уровнями и плотностью функционально значимых триггерных рецепторов. Целью исследования было уточнение вариантов трансформации фенотипа субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ в созданной экспериментальной модели вирусно-бактериальной коинфекции *in vitro*. Исследовано 52 образца периферической крови 13 здоровых взрослых добровольцев в возрасте от 21 до 32 лет. Для воспроизведения условий вирусной, бактериальной и вирусно-бактериальной инфекции образцы инкубировали с формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), двухцепочечной РНК (дцРНК) и совместно, затем определяли фенотипические характеристики субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ с использованием конъюгатов МКАТ CD16-ECD, CD64-FITC, CD32-PE, CD11b-PC5 (Beckman Coulter International S.A., Франция). Анализ полученных данных продемонстрировал, что НГ здоровых взрослых лиц представлены мажорной субпопуляцией CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ и минорной субпопуляцией CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ с разной плотностью мембранных молекул. Минорная субпопуляция CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ значительно увеличилась под влиянием дцРНК, fMLP и дцРНК + fMLP по сравнению с интактными образцами. Сравнительный анализ моновлияния иммуотропных субстанций позволил выявить их разные эффекты в отношении действия на поверхностные рецепторные молекулы CD16, CD32 и однонаправленные, но разной интенсивности на CD11b, как в мажорной, так и в минорной субпопуляциях. Преинкубация с дцРНК с последующим добавлением fMLP в группе исследования позволила выявить эффекты совместного стимулирующего влияния субстанций на уровни поверхностных рецепторов обеих субпопуляций НГ. Нами была создана экспериментальная модель вирусно-бактериальной коинфекции в системе *in vitro* с использованием fMLP и дцРНК и установлены варианты трансформации фенотипа субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ. Данная модель может быть использована для оценки вариантов трансформации фенотипа других субпопуляций НГ, изучения функциональной активности НГ, особенностей формирования NET, влияния на НГ различных иммуотропных субстанций.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, субпопуляция, коинфекция, экспериментальная модель, fMLP, дцРНК.

Introduction

An urgent problem of modern clinical immunology is the creation of new technologies to restore the normal functioning of the immune system in various infectious diseases of bacterial and viral etiology, including mixed infections. The problem of mixed infection in the modern world is recognized as one of the most urgent, since so far this sixth part of the world's set has been affected by this combined pathology [3, 22]. In recent years, in Russia there has been an absolute and relative increase in the incidence of children and adults with various infectious diseases [6, 7]. It has been shown that many viral infections cause a worsening of the course of the chronic inflammatory processes of the respiratory tract

of bacterial etiology due to *S. aureus*, *Str. pneumoniae* [25, 26, 35, 37]. Viral-bacterial mixed infections can significantly change the clinical picture of each infection separately and lead to a more severe course of diseases that are not amenable to standard therapy methods [2, 18].

Neutrophilic granulocytes (NG) are multifunctional cells that have a powerful protective anti-infective effector potential and, in addition, carry out, as a positive, and if necessary, negative regulation of the innate and adaptive immune system [10, 30, 36]. On the other hand, under the influence of certain viruses and/or bacteria, NGs can change their properties. In particular, NG hyperactivation that occurs under the influence of pathogens leads to damage to tissues and organs. At the same time, some viruses

and bacteria can cause damage to NGs themselves, which leads to the appearance of defects in their functioning. In some cases, an acute viral infection can cause neutropenia, functional, regulatory, and other dysfunctions of NG, while cell damage can be either mono or combined. The occurrence of defects in the functioning of NG causes various complications, and, first of all addition of bacterial infections [12]. Grunwell J.R. и et al. (2019) described neutrophil dysfunctions in the respiratory tract in children with acute respiratory failure arising from viral and bacterial co-infections of the lower respiratory tract [23].

Previously, our studies found that immunocompromised children with recurrent viral and bacterial respiratory respiratory infections associated with latent and/or recurrent herpesvirus infections revealed NG dysfunctions with varying degrees of severity of their effector properties. These NG dysfunctions were associated with various phenotypic NG profiles characterized by different levels and expression densities of functionally significant trigger receptors.

The full realization of the effector and regulatory activity of NG is closely related to a certain group of surface membrane proteins CD64, CD32, CD16, CD11b, which form a certain NG phenotype. FcγRs activates endocytosis, phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), the formation of reactive oxygen species (ROS), an oxygen explosion, the secretion of granular enzymatic and non-enzymatic proteins, cytokines, and the formation of neutrophilic extracellular nets (NET) [10, 11, 12, 16, 31].

CD64 (FcγRI) — a high affinity receptor capable of binding human IgG1, IgG3 and IgG4 in monomeric form, is practically not expressed on the membrane surface of unactivated NG blood in healthy individuals [27]. CD64 is a marker for inflammatory processes and infection [20, 21, 29, 38]. CD64 on activated NGs binds to IgG, activates NADPH oxidase, the formation of reactive oxygen species, which leads to increased phagocytosis and the launch of ADCC via an oxygen-mediated mechanism [15, 17].

The expression of the low affinity CD32 (FcγRIIa) receptor for IgG on the NG membrane surface in response to pathogens or cytokines triggers the Ca²⁺-transit and signaling of tyrosine phosphorylation, which leads to activation of NADPH oxidase complex. In addition, CD32 mediates endocytosis, stimulation of secretory activity, cytotoxic mechanisms and immunomodulatory functions of NG [34, 39].

CD16 (FcγRIIIb) is a low-affinity IgG receptor responsible for the cytotoxic function of NG. CD16 is not a phagocytosis receptor, but the binding of FcγRIIIa to FcγRIIIb and the combination of CD16 with IgG initiates signaling cascades for ADCC, degranulation phagocytosis, oxygen burst and proliferation [1, 24]. High expression of CD16 molecules indicates an increased functional activity of NG. A decrease or absence of CD16 on the

membrane surface of NG can indicate immaturity of NG and/or “reverse differentiation” of NG, leading to a decrease in the total number of leukocytes, up to leukopenia, which leads to tissue necrosis or bacterial infection [1]. In addition, it was shown that CD16 molecules are shedding on the cytoplasmic membrane of apoptotic NG [41]. At the same time, it was shown that the CD16 receptor is able to function together with the CD11b/CD18 receptor and enhance FcγRII-mediated internalization.

CD11b (Mac-1) is a neutrophilic surface antigen, which is the α-subunit of the β2-integrin adhesion molecule, a transmembrane heterodimeric NG receptor for the CR3b component of complement [19]. Neutrophilic CD11b is a marker of phagocytosis of activated NG. CD11b is stored in intracellular granules and is additionally expressed on the surface of NG after activation, which promotes adhesion of NG to the endothelium and transendothelial migration into tissues — to the loci of inflammation. An increase in the expression level of CD11b NG molecules is observed in various infections [33]. In addition, Mac-1 is a signaling partner for other receptors, such as the fMLP receptor, LPS receptor (CD14), and Fc receptors. Mac-1 associated with the actin cytoskeleton of NG and signaling proteins is able to regulate chemotaxis, migration, adhesion, phagocytosis, respiratory burst and NG degranulation. Impaired expression of CD11b on NG violates the regulatory mechanisms of the immune system. Blocking CD11b leads to a defect in the activation of Fcγ receptors and impaired phagocytic function of NG [28, 32].

There is no doubt that the cooperation of various receptors plays an important role in the implementation of the effector functions and regulatory mechanisms of NG, the interaction of which can both enhance and weaken the effect of each other [8].

The search for new targeted therapeutic strategies based on the study of immunopathogenetic mechanisms of co-infections is relevant. The study of these mechanisms can help optimize the choice of immunotropic drugs and achieve clinical and immunological remission of atypically occurring infectious processes. In this regard, the development of experimental model *in vitro* of viral-bacterial infections, in which it would be possible to assess the reorganization of the above functionally significant NG receptors, is of particular relevance. Such an experimental model, on the one hand, would allow revealing the features of the transformation of the receptor apparatus; on the other hand, its development is necessary to search for new immunotropic substances for optimal methods for the correction of NG dysfunctions arising from viral-bacterial infections.

Aim: to evaluate the transformation of the phenotype of the subsets CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocytes in created *de novo* experimental model of viral-bacterial infection *in vitro*.

Materials and methods

We examined 52 samples of peripheral blood of 13 healthy adult volunteers (7 women, 6 men) aged 21 to 38 years old. To develop a new experimental model of viral-bacterial infection *in vitro*, 4 groups were formed:

1. Comparison group 1 — intact NG;
2. Comparison group 2 — model of bacterial infection (incubation of NG with fMLP — an analogue of a bacterial pathogen);
3. Comparison group 3 — model of viral infection (incubation of NG with dsRNA — an analogue of a viral pathogen);
4. Study group — created *de novo* model of viral-bacterial infection (incubation of NG with dsRNA, and then with fMLP).

To create experimental conditions for viral infection *in vitro*, we incubated samples with double-stranded RNA (dsRNA). DsRNA is a key activator of innate immunity in viral infections and is a powerful inducer of interferons.

In order to reproduce the conditions of a bacterial infection *in vitro*, we selected N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), which is a bacterial pathogen and, according to various researchers, has activating effects on NG. fMLP may be of exogenous origin (bacteria tripeptide) or endogenous origin (localized in the mitochondria of human cells). fMLP is one of the powerful chemotactic factors of NG, which is able to bind to heterodimeric G-proteins — cell surface receptors. fMLP activates signaling pathways mediated by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), and mitogen-

activated protein kinases (MAPK) which leads to the activation of phagocytosis, chemotaxis, reactive oxygen species generation and release of microbicidal molecules from NG granules.

The experimental study was carried out in several stages:

Stage I — investigation the phenotype of subsets CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG in comparison group 1 (intact NG);

Stage II — investigation phenotype of subsets CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG in comparison group 2 after incubation samples with fMLP (10^{-7} M) for 15 minutes at T 37°C;

Stage III — investigation the phenotype of subsets CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG in comparison group 3 after incubation samples with dsRNA (10^{-6} g/l) for 30 minutes at T 37°C;

Stage IV — investigation the phenotype of subsets CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG in study group in created *de novo* model of viral-bacterial infection (after incubation samples with dsRNA (10^{-6} g/l) for 30 minutes at T 37°C, and then with fMLP (10^{-7} M) for 15 minutes at T 37°C).

The transformation of the phenotype of NG subsets under the influence of substances fMLP, dsRNA and dsRNA + fMLP was evaluated by flow cytometry (FC 500, Beckman Coulter, USA) using MAbs conjugates CD16-ECD, CD64-FITC, CD32-PE, CD11b-PC5 (Beckman Coulter International S.A., France). We determined the number (in %) of subsets of CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and the intensity of expression of each receptor (CD64, CD32, CD16, CD11b) according to MFI.

Statistical processing of the obtained data was carried out using computer programs Microsoft Excel 2016 and StatPlus 2010 using nonparametric Wilcoxon and Mann–Whitney tests. The results were presented as the median (upper and lower quartile) Me (Q1; Q3). Significance of differences was determined at $p < 0.05$.

Results

Data showed that NG in healthy adults is represented by a subset of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG in 96.1 (93.7; 97.2)% — major subset and a subset CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG in 0.2 (0.1; 1.9)% — minor subset; expression density of membrane molecules of these subset is different. The subset CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG with CD64 receptor has a higher level of MFI CD16 — 30.4 (24.6; 36.0), CD32 — 5.32 (4.9; 6.3) and CD11b — 67.2 (54.8; 71.1) ($p_{1,2,3} < 0,05$) (Fig. 1).

Incubation of samples with fMLP (comparison group 2) led to an 18-fold increase in CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG ($p < 0.05$) and a decrease in CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG ($p > 0.05$) (Fig. 2).

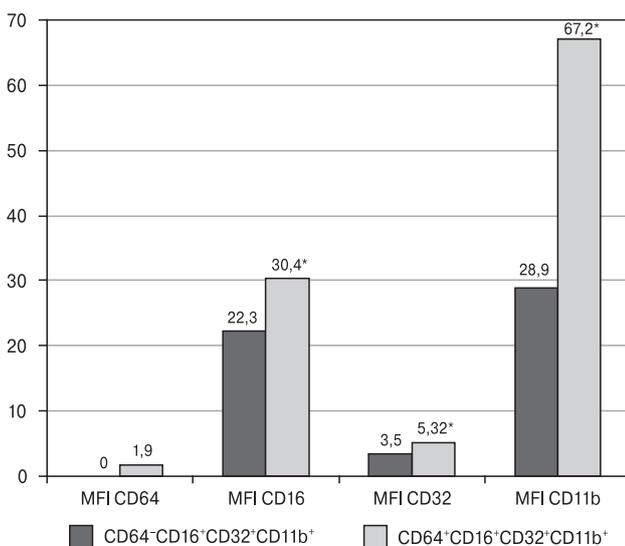


Figure 1. Characteristic of receptors of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG subsets in healthy adult subjects

Note. * — statistically significant differences, $p < 0.05$.

The level of MFI CD16 increased 1.4 times ($p < 0.05$) and CD11b increased 3.3 times ($p < 0.05$) in the major subset after incubation of samples with fMLP. This indicates the readiness of NG healthy adults to develop an adequate response to exogenous and endogenous pathogens and various injuries. There was no significant effect of fMLP on the MFIs of NG receptors in the minor subset (Table).

Minor subset of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ NG significantly increased by 20 times ($p < 0.05$) under the influence of dsRNA in comparison group 3, the levels of membrane receptors CD32 and CD11b were also higher than in comparison group 1 ($p_1 < 0.05$, $p_2 < 0.05$). Significant effects of dsRNA influence on the $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ NG subset and levels of CD16 and CD32 molecules were absent; the level of MFI CD11b was 2 times higher compared with comparison group 1 ($p < 0.05$) (Table).

Upon incubation with fMLP, the level of CD16 receptor increased statistically significantly in the subset of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ NG ($p < 0.05$), while the effect of dsRNA showed a slight decrease ($p > 0.05$). Incubation with dsRNA led to an increase in the expression of the CD32 receptor by 1.5 times on the NG subset of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ ($p < 0.05$) and 1.34 times on the NG subset of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ NG ($p > 0.05$), while significant effects of fMLP were absent.

Preincubation with dsRNA followed by the addition of fMLP in the study group revealed the effects of a joint stimulating effect of substances on the MFI levels of surface receptors of both subsets of NG. The content of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ subsets

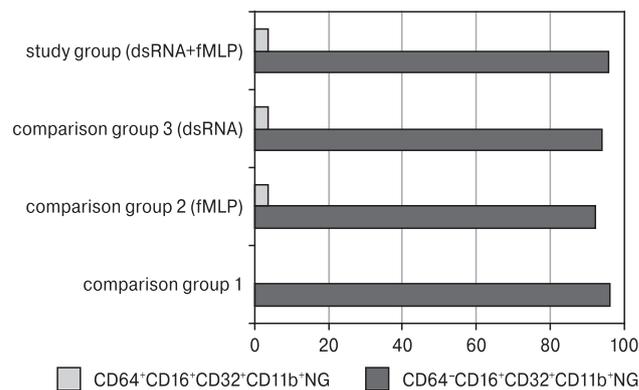


Figure 2. Transformation of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ and $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ neutrophilic granulocytes subsets under the influence of fMLP and dsRNA

Note. * — differences are significant compared with comparison group 1, $p < 0.05$.

of NG ($p < 0.05$) significantly increased, the MFI of all receptors also increased: CD64 by 1.1 times, CD16 — 1.4 times, CD32 — 1.56 times, CD11b by 1.78 times ($p_1 < 0.05$; $p_2 < 0.05$; $p_3 < 0.05$; $p_4 < 0.05$) (Table, Fig. 2). The combined effect of both substances did not change the content of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ subsets of NG and led to an increase in the expression density of CD16 by 1.15 times, CD32 — 1.5 times, CD11b — 1.53 times ($p_1 < 0.05$; $p_2 < 0.05$; $p_3 < 0.05$) (Table).

A comparative analysis of the effect of immunotropic substances revealed multidirectional effects on the receptor molecules CD16, CD32 and the uni-

Table. The effect of fMLP and dsRNA on phenotype of $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ and $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ neutrophilic granulocytes subsets in healthy adults *in vitro*, Me (Q1; Q3)

Группы Groups	$CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$			
	NG, %	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b
Comparison group 1	96,1 (93,7; 97,2)	22,3 (18,3; 24,9)	3,5 (3,09; 4,28)	28,9 (19,5; 37,9)
Comparison group 2 (fMLP)	91,5 (90,0; 95,7)	30,5* (27,5; 36,9)	3,8 (3,21; 5,1)	71,4* (69,15; 98,3)
Comparison group 3 (dsRNA)	93,4 (91,7; 96,2)	21,6^ (19,1; 24,5)	4,7 (2,97; 6,3)	57,9*^ (46,0; 65,3)
Study group (dsRNA + fMLP)	94,7 (94,7; 96,2)	25,5*• (25,5; 34,8)	5,2*# (5,12; 6,9)	73,2*• (73,2; 98,25)
Группы Groups	$CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$			
	NG, %	MFI CD64	MFI CD16	MFI CD11b
Comparison group 1	0,2 (0,1; 1,9)	1,9 (1,45; 2,09)	30,4 (24,6; 36)	5,32 (4,9; 6,3)
Comparison group 2 (fMLP)	3,7* (2,9; 5,7)	2,26 (1,8; 2,4)	31,3 (27,2; 35,5)	6,1 (5,1; 7,0)
Comparison group 3 (dsRNA)	4,2* (2,9; 5,7)	2,15 (1,8; 2,2)	22,6 (19,5; 34,2)	8,2*^ (7,34; 11,3)
Study group (dsRNA + fMLP)	3,85* (3,8; 5,66)	2,1* (2,13; 2,43)	40,7*#• (40,65; 74,2)	119,9*#• (119,0; 166)

Notes. * — the differences are significant compared with the comparison group 1, $p < 0.05$; ^ — differences are significant between comparison group 2 and comparison group 3, $p < 0.05$; # — differences are significant between the study group and the comparison group 2, $p < 0.05$; • — differences are significant between the study group and the comparison group 3, $p < 0.05$.

directional effect on CD11b, both in the major and minor subsets (Fig. 3).

We identified a tendency to increase MFI CD32 in the study group in the major subset; the level of MFI CD11b increasing under the mono influence of dsRNA or fMLP ($p_1 < 0.05$; $p_2 < 0.05$) remains at the level of the effect induced by fMLP. In contrast, the MFI CD16 receptor is reduced in equipment density, which is similar to the fMLP effect.

Sequential incubation with dsRNA and fMLP caused statistically significant effects of an increase in the number of CD16 and CD64, which was not established with mono-influence of substances in a subset of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG. Noteworthy are the higher levels of MFI CD32 and CD11b detected by the combined effect of dsRNA and fMLP in the study group compared with the effects identified in comparison group 3.

Discussion

NGs fight viral and bacterial infections through the implementation of phagocytic activity, the ability to extracellularly degranulate enzymatic and non-enzymatic proteins, exosomes, initiating the development of a basic inflammatory response, forming NET, producing reactive oxygen species, synthesiz-

ing and secreting pro- and anti-inflammatory cytokines and, thus, regulate the work of both the innate and adaptive immune systems. It has been shown that there are subsets of NG with both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties. At the same time, NGs are plastic and, depending on the conditions in which they are (contact with various antigens, change of cytokine background, hormonal effects, etc.), can change the phenotype, acquiring new or losing existing useful properties. In turn, various viruses and bacteria lead their struggle for survival and can cause both quantitative and functional disorders of NG: neutropenia, defects in phagocytic activity, which leads to violations of their killing properties and microbicidal activity, suppression of the production of reactive oxygen species, depression of antiviral and antibacterial activity, inability to form NET, negative transformation of functionally significant subsets, and etc. Defective functioning of NG leads to the appearance of atypically occurring, not responding to the standard therapy of viral and bacterial infections, as well as viral-bacterial mixed infections, which negatively affects their prognosis and outcomes of diseases [4, 5, 10, 11, 14].

For the first time, we performed a comparative analysis of the phenotype reorganization of two functionally significant subsets of blood CD64⁺CD32⁺

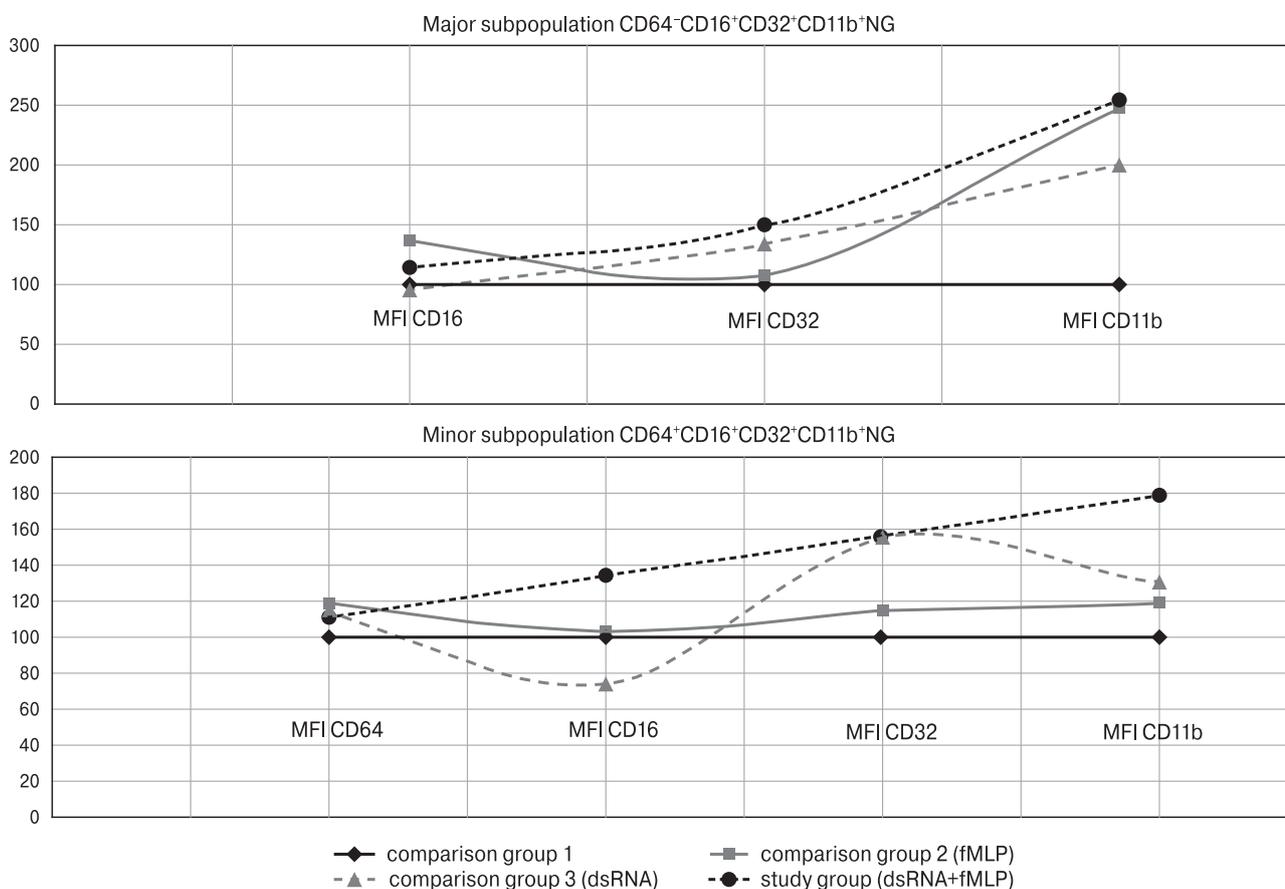


Figure 3. Subset phenotype transformation under the influence of immunotropic substances *in vitro*

CD16⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG in models of viral infection, bacterial infection and viral-bacterial co-infection.

The results demonstrate that in the peripheral blood under physiological conditions the major subset of CD64[−]CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG predominates. This subset is 96.1% and is characterized by moderate expression of CD16, CD32, CD11b molecules and very low level or complete absence of CD64 molecules. The minor subset is only 0.2%, has a CD64 receptor, and higher expression levels of CD16, CD32, CD11b than in the major subset. The data obtained suggest that the major subsets are inherent in the properties of the “watchful guard”, ready, if necessary, to rebuild and activate their potential. A minor subset, circulating in a very small amount, is more active and able to provide immediate protection.

The contact of a major subset of NG with a bacterial pathogen leads to an increase in the expression of molecules of CD16 and CD11b on the surface membrane. It is known that an increase in the expression of CD16 molecules indicates an increased functional activity of NG [1, 24]. Therefore, an increase in the expression density of CD16 on the NG membrane promotes the launch of ADCC, an increase in phagocytic activity, transmembrane degranulation, production of reactive oxygen species, etc. It is also known that a simultaneous increase in the expression of CD11b and CD16 molecules can enhance CD32-mediated internalization.

The number of NG minor subsets of CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG significantly increased from 0.2% to 3.7% — by 18.5 times, due to the fact that about 4% of NG major subset, being in closed experimental system, transformed into an activated minor subset under the influence of the bacterial pathogen.

The high affinity CD64 receptor is practically not expressed on the membrane surface of non-activated NG in the blood in healthy individuals [27]. The appearance of the CD64 molecule on the NG membrane has a direct connection with the activation of cells by the bacterial antigen, followed by translocation of this molecule from the granular apparatus of the cell to the surface membrane of NG. It should be noted that the level of membrane molecules CD11b, CD16, CD32 in the minor subset did not change under the influence of the bacterial pathogen and remained at the level of comparison group 1.

After dsRNA exposure, the minor subset of CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG significantly increased from 0.2% to 4.2% due to the fact that the NG major subset reoriented into the activated minor subset due to the translocation of the CD64 molecule from the cytoplasmic space to the surface membrane. In addition, there was a significant increase in the expression density of CD32 and CD11b receptors, and a decrease in CD16 molecules, which, apparently, is associated with shedding of CD16 under the influence of dsRNA.

In the created model of viral-bacterial co-infection obtained by sequential exposure to dsRNA and then fMLP, we revealed completely different profiles of phenotypic changes, both major CD64[−]CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and minor CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG subsets. Taking into account the specific features of the phenotype of the CD64[−]CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG subset, it can be concluded that this subset is more active in the model of viral-bacterial infection than in other experimental models.

In the minor subset of CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG under the influence of the bacterial pathogen and dsRNA, we found a significant increase in the number of NG expressing CD64 from 0.2% to 3.85% — 19.25 times. The expression density of CD32, CD16, CD11b molecules was the highest in the model of viral-bacterial infection, not only in comparison with healthy individuals, but also in comparison with the data obtained in the models of viral and bacterial infection. The data obtained suggest that the experimental model of viral-bacterial infection has a superactivated phenotype of a minor subset with possible defective phagocytic and oxidase microbicidal activity. Similar changes were previously discovered by J.R. Grunwell and colleagues (2019) [23], who revealed the presence of NG dysfunctions in acute distress syndrome in children with viral and bacterial co-infections of the lower respiratory tract. The NG of these patients had an increased level of activation markers on the cytoplasmic membrane, but paradoxical facts were established: a decrease in the ability of NG to kill bacteria in the reaction of phagocytosis, a defective respiratory burst, and impaired transmigration activity of NG.

In other words, a significant remodeling of the phenotype of the CD64[−]CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG subsets in *de novo* experimental model of viral-bacterial infection *in vitro* was performed. Remodeling of the phenotype of both the major and minor subsets was significantly different from the changes obtained in both the viral model and the bacterial infection model.

Conclusion

Thus, we reproduced models of bacterial infection using fMLP, viral infection using dsRNA and created a new model of viral-bacterial co-infection in a comparative experimental study *in vitro*. It was shown that functionally significant subsets of NGs CD64[−]CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG respond differently to the mono- and combined effects of fMLP, dsRNA substances. It was established that each of the models is characterized by its own options for reorienting the phenotype of subsets CD64[−]CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG. The most significant transforma-

tion of the NG phenotype was obtained in a new model of viral-bacterial co-infection: there was an intense activation of the major subset CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and overactivation of the minor subset of CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, which may be associated with acquired defects in the functioning of NG.

Created *in vitro* experimental model of viral-bacterial co-infection can be used to evaluate the transformation of other subsets NG with different phenotype, to study the features of the functional activity of NG,

to assess changes in their effector, secretory and regulatory functions, and the ability to form NET.

The model of viral-bacterial co-infection that we developed can be used in immunopharmacology to study the characteristics of the effect of immunotropic substances on the NG phenotype. The data obtained are promising for the development of new targeted immunotherapeutic strategies for the correction of the negatively transformed phenotype of defectively functioning subsets of NG in viral-bacterial and other co-infections.

References

1. Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Песков А.Б., Генинг С.О. Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 6. С. 1127–1138. [Abakumova T.V., Gening T.P., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Peskov A.B., Gening S.O. Phenotype of circulating neutrophils at different stages of cervical neoplasia. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 6, pp. 1127–1138. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138
2. Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Вирусно-бактериальные коинфекции как глобальная проблема современной медицины // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2018. Т. 22, № 1. С. 29–42. [Balmasova I.P., Malova E.S., Sepiashvili R.I. Viral and bacterial coinfection as a global problem of modern medicine. *Vestnik RUDN = RUDN Journal of Medicine*, 2018, vol. 22, no. 1, pp. 29–42. (In Russ.)] doi: 10.22363/2313-0245-2018-22-1-29-42
3. Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Малова Е.С., Ефратова Е.П., Ющук Н.Д. Коинфекция вирусами иммунодефицита человека и гепатита С как модель иммунного ответа на патогены имунотропного действия // Аллергология и иммунология. 2019. Т. 20, № 1. С. 5–9. [Balmasova I.P., Sepiashvili R.I., Malova E.S., Efratova E.P., Yushchuk N.D. Co-infection with HIV and hepatitis C virus as a model of the immune response to pathogens of immunotropic action. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2019, vol. 20, no. 1, pp. 5–9. (In Russ.)]
4. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 9–38 [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Y., Kuznetsova E.K. Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 9–38. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38
5. Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18 (1). С. 30–37. [Dolgushin I.I. Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances. *Bulleten' sibirskoy mediciny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, vol. 18, no. 1, pp. 30–37. (In Russ.)] doi: 10.20538/1682-0363-2019-1-30-37
6. Егоров А.Ю. Проблема бактериальных осложнений при респираторных вирусных инфекциях // Microbiology Independent Research Journal. 2018. Т. 5, № 1. С. 1–11. [Egorov A.Yu. The problem of bacterial complications post respiratory viral infections. *Microbiology Independent Research Journal*, 2018, vol. 5, no. 1, pp. 1–11. (In Russ.)] doi: 10.18527/2500-2236-2018-5-1-1-11
7. Ивардава М.И. Место иммуномодуляторов в лечении острой респираторной инфекции у часто болеющих детей // Вопросы современной педиатрии. 2011. Т. 10, № 3. С. 103–107. [Ivardava M. Use of immunomodulators in acute respiratory infection treatment in frequently ill children. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 103–107. (In Russ.)]
8. Киселева Е.П. Новые представления о противoinфекционном иммунитете // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 1. С. 9–14. [Kiseleva E.P. New aspects of anti-infection immunity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 9–14. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2011-1-9-14
9. Лобзин Ю.В., Рычкова С.В., Скрипченко Н.В., Усков А.Н., Федоров В.В. Динамика инфекционной заболеваемости у детей в Российской Федерации в 2017–2018 годах // Медицина экстремальных ситуаций. 2019. Т. 21, № 3. С. 340–350. [Lobzin Yu.V., Rychkova S.V., Skripchenko N.V., Uskov A.N., Fedorov V.V. Dynamics of infectious morbidity rate in children in the Russian Federation for the period of 2017–2018. *Meditsina ekstremalnykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 340–350. (In Russ.)]
10. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 219–230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Yevglevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 219–230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230
11. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 7–18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Yevglevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 7–18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18
12. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология. 2015. Т. 36, № 4. С. 257–265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Yevglevsky A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at “old players” on the immunological field. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 36, no. 4, pp. 257–265. (In Russ.)]

13. Нестерова И.В., Нгуен Т.З., Халтурина Е.О., Хайдуков С.В., Гурьянова С.В. Модулирующие эффекты глюкозаминил-мурамилдипептида на трансформированный фенотип субпопуляции IFN α / β RI+IFN γ +TLR4+ нейтрофильных гранулоцитов пациентов с хроническими герпесвирусными инфекциями в эксперименте *in vitro* // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 379–384. [Nesterova I., Nguyen T., Khalturina E., Khaidukov S., Guryanova S. The modulatory effects of glucosaminylmuramildipeptide on the transformed phenotype of the subset of IFN α / β RI+IFN γ +TLR4+ neutrophilic granulocytes of patients with chronic herpes-viral infections in the experiment *in vitro*. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, vol.12 (21), no. 3, pp. 379–384. (In Russ.)]
14. Пинегин Б.В., Дагиль Ю.А., Воробьева Н.В., Пашенков М.В. Влияние азоксимера бромиды на формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек // Русский медицинский журнал. 2019. Т. 27, № 1 (II). С. 42–46. [Pinegin B.V., Dagil Yu.A., Vorobieva N.V., Pashchenkov M.V. Azoximer bromide effect on the neutrophil extracellular traps formation. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2019, vol. 27, no. 1 (II), pp. 42–46. (In Russ.)]
15. Bourgoïn P., Biéché G., Ait Belkacem I., Morange P.E., Malergue F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2020, vol. 8, no. 1, pp. 106–123. doi: 10.1002/iid3.289
16. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fc γ receptors on myeloid cells. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 6. doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016
17. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385
18. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Vlaar A.P., Koenderman L., Bem R.A. van Woensel J.B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clin. Immunol.*, 2017, vol. 176, pp. 100–106. doi: 10.1016/j.clim.2016.12.012
19. Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, vol. 61, no. 8, pp. 1155–1167. doi: 10.1007/s00262-012-1294-5
20. El-Madbouly A.A., El Sehemawy A.A., Eldesoky N.A., Abd Elgalil H.M., Ahmed A.M. Utility of presepsin, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, and neutrophil CD64 for early detection of neonatal sepsis. *Infect. Drug Resist.*, 2019, vol. 12, pp. 311–319. doi: 10.2147/IDR.S191533
21. El-Raggal N.M., El-Barbary M.N., Youssef M.F., El-Mansy H.A. Neutrophil-surface antigens CD11b and CD64 expression: a potential predictor of early-onset neonatal sepsis. *Egypt J. Pediatr. Allergy Immunol.*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 90–100. doi: 10.1097/INF.0b013e318256fb07
22. Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A., Petchey O.L. The nature and consequences of coinfection in humans. *J. Infect.*, 2011, vol. 63, no. 3, pp. 200–206. doi: 10.1016/j.jinf.2011.06.005
23. Grunwell J.R., Giacalone V.D., Stephenson S. Margaroli C., Dobosh B.S., Brown M.R., Fitzpatrick A.M., Tirouvanziam R. Neutrophil dysfunction in the airways of children with acute respiratory failure due to lower respiratory tract viral and bacterial coinfections. *Scient. Rep.*, 2019, vol. 9: 2874. doi: 10.1038/s41598-019-39726-w
24. Hoffmeyer F., Witte K., Schmidt R.E. The high-affinity Fc γ RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology*, 1997, vol. 92, pp. 544–552. doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00381.x
25. Ishikawa H., Fukui T., Ino S., Sasaki H., Awano N., Kohda Ch., Tanaka K. Influenza virus infection causes neutrophil dysfunction through reduced G-CSF production and an increased risk of secondary bacteria infection in the lung. *Virology*, 2016, vol. 499, pp. 23–29. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.0252016
26. Kwon Y.S., Park S.H., Kim M.A., Kim H.J., Park J.S., Lee M.Y., Lee C.W., Dauti S., Choi W.I. Risk of mortality associated with respiratory syncytial virus and influenza infection in adults. *BMC Infect. Dis.*, 2017, vol. 17 (1): 785. doi: 10.1186/s12879-017-2897-4
27. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J., Meller S., Chamilo G., Sebasigari R., Riccieri V., Bassett R., Amuro H., Fukuhara S., Ito T., Liu Y.J., Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3, no. 73: 73ra19. doi: 10.1126/scitranslmed.3001180
28. Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., Freeman B.A., Daiber A., Gehling U.M., Brümmer J., Rudolph V., Münzel T., Heitzer T., Meinertz T., Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 2, pp. 431–436. doi: 10.1073/pnas.0405193102
29. Li S., Huang X., Chen Z., Zhong H., Peng Q., Deng Y., Qin X., Zhao J. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a metaanalysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 17, no. 1, pp. 12–23. doi: 10.1016/j.ijid.2012.07.017
30. Mantovani A., Cassatella M., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, pp. 519–531. doi: 10.1038/nri3024
31. Nailwal H., Chan F.K. Necroptosis in anti-viral inflammation. *Cell Death Differ.*, 2019, vol. 26, no. 1, pp. 4–13. doi: 10.1038/s41418-018-0172-x
32. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 34–47.
33. Peñaloza H.F., Salazar-Echegarai F.J., Bueno S.M. Interleukin 10 modulation of neutrophil subsets infiltrating lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Biochem. Biophys. Rep.*, 2018, vol. 13, pp. 12–16. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.11.004
34. Rollet-Labelle E., Gilbert C., Naccache P.H. Modulation of human neutrophil responses to CD32 cross-linking by serine/threonine phosphatase inhibitors: cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, no. 2, pp. 1020–1028. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.1020
35. Sharma-Chawla N., Sender V., Kershaw O., Gruber A.D., Volckmar J., Henriques-Normark B., Stegemann-Koniszewski S., Bruder D. Influenza A Virus infection predisposes hosts to secondary infection with different *Streptococcus pneumoniae* serotypes with similar outcome but serotype-specific manifestation. *Infect. Immun.*, 2016, vol. 84, no. 12, pp. 3445–3457. doi: 10.1128/IAI.00422-16

36. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.*, 2014, vol. 1124, pp. 451–467. doi: 10.1007/978-1-62703-845-4_279
37. Tang F.S.M., Van Ly D., Spann K., Reading P.C., Burgess J.K., Hartl D., Baines K.J., Oliver B.G. Differential neutrophil activation in viral infections: enhanced TLR-7/8-mediated CXCL8 release in asthma. *Respirology*, 2016, vol. 21, no. 1, pp. 172–179. doi: 10.1111/resp.12657
38. Tan T.L., Ahmad N.S., Nasuruddin D.N., Ithnin A., Tajul Arifin K., Zaini I.Z., Wan Ngah W.Z. CD64 and group II secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as biomarkers for distinguishing adult sepsis and bacterial infections in the emergency department. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 3: e0152065. doi: 10.1371/journal.pone.0152065
39. Unkeless J.C., Shen Z., Lin C.W., De Beus E. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. *Semin. Immunol.*, 1995, vol. 7, no. 1, pp. 37–44. doi: 10.1016/1044-5323(95)90006-3
40. Van Spriël A.B., Leusen J.H., van Egmond M.W. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001, vol. 97, no. 8, pp. 2478–2486. doi: 10.1182/blood.V97.8.2478
41. Youinou P., Durand V., Renaudineau Y., Pennec Y.L., Saraux A., Jamin C. Pathogenic effects of anti-Fc gamma receptor IIIb (CD16) on polymorphonuclear neutrophils in non-organ-specific autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2002, vol. 1, no. 1–2, pp. 13–19. doi:10.1016/s1568-9972(01)00002-7

Авторы:

Нестерова И.В., д.м.н., профессор кафедры аллергологии и иммунологии, ФГАБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России, Москва, Россия; главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

Чудилова Г.А., к.б.н., доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, зав. отелом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

Русинова Т.В., к.б.н., научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

Павленко В.Н., аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, лаборант-исследователь отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

Юцкевич Я.А., младший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

Барова Н.К., к.м.н., ассистент кафедры хирургических болезней детского возраста, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

Тараканов В.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургических болезней детского возраста, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия.

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology, People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation; Head Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Chudilova G.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FCE and RS, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Rusinova T.V., PhD (Biology), Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Pavlenko V.N., PhD Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FCE and RS, Investigator (Biologist), Department of Clinical Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Yutskevich Ya.A., Junior Researcher, Department of Clinical Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Barova N.K., PhD (Medicine), Assistant, Department of Pediatric Surgical Diseases, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Pediatric Surgical Diseases, Kuban State Medical University of Russia, Krasnodar, Russian Federation.

ОСНОВНЫЕ И МАЛЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ

А.А. Жирков¹, Л.А. Алексеева¹, Г.Ф. Железникова¹, Н.В. Скрипченко^{1,2},
Н.Е. Монахова¹, Т.В. Бессонова¹

¹ ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Введение.* Анализ современных литературных данных указывает на недостаточную изученность субпопуляционного состава лимфоцитов крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) при нейроинфекциях у детей. Установлено, что клетки основных популяций лимфоцитов делятся на множество малых (минорных) субпопуляций. *Цель данного исследования* — изучить относительное содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ детей, переносящих серозный менингит (СМ) (вирусный) или гнойный менингит (ГМ) (бактериальный). *Материалы и методы.* Методом проточной цитометрии проведено фенотипирование лимфоцитов крови и ЦСЖ детей в возрасте от 4 месяцев до 17 лет с диагнозом СМ (n = 86) и ГМ (n = 39). В качестве сравнения исследованы образцы крови и ЦСЖ детей, переносящих ОРВИ с синдромом менингизма (n = 27). Исследовано относительное содержание основных субпопуляций: CD3⁺ Т-лимфоцитов, Т-хелперов — CD3⁺CD4⁺ Th, цитотоксических Т-лимфоцитов — CD3⁺CD8⁺ CTL, натуральных киллеров — CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK, В-клеток — CD3⁻CD19⁺; малых субпопуляций лимфоцитов: двойных позитивных (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), двойных негативных (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) Т-клеток, NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}). *Результаты.* В остром периоде ГМ и СМ в крови и ЦСЖ выявлены достоверные отличия от группы сравнения в содержании основных и малых субпопуляций лимфоцитов. Характерным для субпопуляционного состава лимфоцитов крови при СМ явилось преобладание Т-клеток, Th, CTL, NK, NKT, DN, CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{bright} и CD3⁺CD8^{dim} при существенном более низком содержании В-клеток по сравнению с ГМ. В ЦСЖ детей с СМ превалировали Т-клетки и Th, тогда как количество В-клеток и CD3⁻CD8⁺ NK было ниже по сравнению с показателями при ГМ. В динамике заболевания также выявлены различия субпопуляционного состава ЦСЖ и крови в зависимости от нозологической формы при сохранении отличий от группы сравнения некоторых основных и малых субпопуляций лимфоцитов. Расчет соотношения «ликвор/кровь» для основных и малых субпопуляций лимфоцитов выявил в группе сравнения превалирование в ЦСЖ большинства субпопуляций (коэффициенты варьировали от 1,2 до 16,4), за исключением В-клеток, NK и CD3⁻CD8⁺NK, количество которых в ЦСЖ было сниженным по сравнению с кровью (коэффициенты варьировали от 0,07 до 0,31). При СМ и ГМ происходили различные изменения соотношения

Адрес для переписки:

Жирков Антон Анатольевич
197002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9,
ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней ФМБА России.
Тел.: 8 (911) 932-55-32 (моб.).
E-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

Contacts:

Anton A. Zhirkov
197002, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 9,
Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases
of the Russian Federal Medical-Biological Agency.
Phone: +7 (911) 932-55-32 (mobile).
E-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

Для цитирования:

Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В.,
Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Основные и малые субпопуляции
лимфоцитов крови и цереброспинальной жидкости при менингитах
у детей // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 111–122.
doi: 10.15789/2220-7619-MAM-1255

Citation:

Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V.,
Monakhova N.E., Bessonova T.V. Major and minor lymphocytes subpopulations
in peripheral blood and cerebrospinal fluid of children with meningitis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,
vol. 11, no. 1, pp. 111–122. doi: 10.15789/2220-7619-MAM-1255

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Комитета по науке и высшей школе правительства Санкт-Петербурга в 2017 году.

«ЦСЖ/кровь» для большинства исследованных субпопуляций в остром периоде и периоде реконвалесценции с характерными особенностями для каждой нозологической формы. *Заключение.* Полученные результаты свидетельствуют о наличии особенностей в активации системного и интратекального иммунного ответа при серозных (вирусных) и гнойных (бактериальных) менингитах у детей и могут быть использованы в качестве дополнительного дифференциально-диагностического критерия.

Ключевые слова: иммунофенотипирование, лимфоциты, минорные субпопуляции, кровь, цереброспинальная жидкость, серозный менингит, бактериальный гнойный менингит, дети.

MAJOR AND MINOR LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH MENINGITIS

Zhirkov A.A.^a, Alekseeva L.A.^a, Zheleznikova G.F.^a, Skripchenko N.V.^{a,b}, Monakhova N.E.^a, Bessonova T.V.^a

^a Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Russian Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. The analysis of current publications indicates at our insufficient understanding of subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) during pediatric neuroinfectious diseases. It has been found that the main lymphocyte populations are divided into many small (minor) subpopulations. The *purpose of this research* was to assess percentage of major and minor blood and CSF lymphocyte subsets in children with aseptic viral meningitis (AM) or bacterial purulent meningitis (BM). *Materials and methods.* Phenotyping of blood and CSF lymphocytes of children aged from 4 months to 17 years diagnosed with AM (n = 86) and BM (n = 39) was carried out by using flow cytometry. As a comparison group, we analyzed peripheral blood and CSF samples collected from children with acute respiratory viral infections (ARVIs) associated with syndrome of meningism (n = 27). There was evaluated percentage of the major cell subpopulations (CD3⁺ T-lymphocytes, T-helpers — CD3⁺CD4⁺ Th, cytotoxic T-lymphocytes — CD3⁺CD8⁺ CTL, natural killer cells — CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK, B-cells — CD3⁻CD19⁺), as well as minor lymphocyte subsets (double positive (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), double negative (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T-cells, NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{dim} and CD3⁺CD8^{bright}). *Results.* It was found that the acute period of BM and AM vs. the comparison group (ARVI) was characterized by significant differences in the blood and CSF composition of major and minor lymphocyte subsets. In particular, blood T-cells, Th, CTL, NK, NKT, DN, CD3⁻CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{bright} and CD3⁺CD8^{dim} dominated in parallel with significantly lowered B-cell frequency in AM vs. BM. In the CSF of children with AM, T-cells and Th prevailed, whereas count of B-cells and CD3⁻CD8⁺ NK was lower compared to those in BM. In addition, further differences were revealed in CSF and blood cell subset composition depending on nosological entity, while maintaining differences in some major and minor lymphocyte subpopulations lacked in the comparison group. Calculating the CSF/blood ratio for the major and minor lymphocyte subsets uncovered the prevalence for the majority of cell subpopulations (the coefficients ranged from 1.2 to 16.4) in the CSF of the comparison group (ARVI), except B-cells, NK and CD3⁻CD8⁺ NK (coefficients ranged from 0.07 to 0.31). AM and BM were featured with various changes in the CSF/blood ratio found for most of the studied subpopulations in the acute period as well as the recovery phase highlighted with characteristic traits for each nosological form. *Conclusion.* The data obtained indicate about finding specific features in the activation of systemic and intrathecal immune response during viral and bacterial meningitis in children, which may be used as an additional differential diagnostic criterion.

Key words: immunophenotyping, lymphocytes, minor subsets, blood, cerebrospinal fluid, aseptic meningitis, bacterial purulent meningitis, children.

Введение

В клинической лабораторной диагностике общепринято оценивать клеточный иммунный ответ на инфекцию путем исследования в биологических жидкостях субпопуляций лимфоцитов (Т, В и натуральных киллеров [NK]). Экспрессия CD4 и CD8 на CD3⁺ клетках является основой для выделения Т-хелперов (Th, CD3⁺CD4⁺) и Т-цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ, CTL, CD3⁺CD8⁺) — главных компонентов адаптивного иммунного ответа. В последние годы установлено, что клетки основных

популяций лимфоцитов делятся на множество малых (минорных) субпопуляций, функции которых изучены недостаточно [5]. В периферической крови и в зоне воспаления находят Т-лимфоциты, негативные по маркерам CD4 и CD8 (Double Negative — DN) либо экспрессирующие на поверхности и тот, и другой антиген (Double Positive — DP). Ранее эти клеточные субпопуляции рассматривали как промежуточные формы созревания Th и CTL. Однако позднее было установлено, что молекулы CD4 и CD8 могут коэкспрессироваться либо отсутствовать на зрелых Т-лимфоцитах, являясь ак-

тивными участниками иммунного ответа [38]. У DP лимфоцитов обнаружены цитотоксический потенциал [21] и иммуносупрессорная активность за счет синтеза противовоспалительных цитокинов (IL-10) [12]. DN (CD4⁻CD8⁻) Т-лимфоциты в зависимости от фенотипа (CD25 и CD44) также проявляют широкий спектр реакций — от продукции провоспалительных цитокинов (IL-2, TNF α , IFN γ) до супрессии антиген-специфического Т-клеточного ответа [12]. На основе разной интенсивности флуоресценции установлена гетерогенность популяции Т-клеток, экспрессирующих CD8 с высокой (CD8^{bright}) и низкой интенсивностью (CD8^{dim} или CD8^{low}). CD3⁺CD8^{bright}- и CD3⁺CD8^{dim}-клетки различаются уровнем экспрессии цитокинов и функциональными характеристиками [12]. Кроме CD3⁺ Т-лимфоцитов, молекула CD8 с низкой интенсивностью может экспрессироваться на CD3⁻ лимфоцитах (CD3⁻CD8^{dim}). Эти клетки экспрессируют CD16 и CD56, являясь одной из субпопуляций NK [10]. Еще одной гетерогенной клеточной субпопуляцией, обладающей цитотоксичностью и рассматриваемой в качестве важного звена врожденного иммунного ответа, выступают NKT-клетки (Natural Killer T-cells). NKT-клетки входят в первую линию защиты от патогенов и обеспечивают связь между врожденным и адаптивным иммунным ответом [30, 31, 32], разделяя обе эти функции с NK [16]. Эксперименты, проведенные на зараженных вирусом мышах, показали, что NKT-клетки реализуют защитную функцию за счет изменения профиля цитокинов и специфического иммунного ответа на вирус [37]. Анализ современных литературных данных указывает на недостаточную изученность функций минорных субпопуляций лимфоцитов, их динамику и диагностическое значение при инфекционной патологии, в частности при нейроинфекциях у детей. Ранее авторами были обнаружены различия состава основных субпопуляций лимфоцитов в крови и ликворе детей, переносящих серозный (вирусный) (СМ) или гнойный (бактериальный) менингит (ГМ) [2]. Представляет интерес сопоставление на большем материале уровня и динамики как основных субпопуляций лимфоцитов, так и ряда малых субпопуляций, возможно, участвующих в патогенезе менингита. Цель настоящей работы — изучить относительное содержание основных (CD3⁺ Т-клеток, CD3⁺CD4⁺ Th, CD3⁺CD8⁺ CTL, CD3⁻CD19⁺ В-клеток, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK) и малых субпопуляций лимфоцитов (NKT, CD3⁻CD8⁺ NK, DP и DN Т-клеток), а также субпопуляций CTL (CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}) в крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) детей, переносящих СМ или ГМ.

Материалы и методы

Проведено параллельное исследование крови и ликвора детей в возрасте от 4 месяцев до 17 лет, поступивших в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России с диагнозом СМ (n = 86), ГМ (n = 39). Возраст детей в группе с СМ колебался в диапазоне от 0,3 до 17,3 лет, медиана (Me) — 9,5 лет, в группе с ГМ — от 0,3 до 15 лет (Me — 2,9 лет). Для сравнения использованы образцы крови 9 детей в возрасте от 2,4 до 16,3 лет (Me — 12,9 лет) и образцы ликвора 28 детей с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ), протекающей с менингеальными симптомами, в возрасте от 2,4 до 17,8 лет (Me — 8 лет). Использованы остатки образцов крови и ликвора, поступающие для стандартного лабораторного исследования (разрешение локального этического комитета: протокол № 93 от 07.11.17). Критерием исключения являлось наличие хронических инфекционных заболеваний (гепатита). В основных группах незначительно преобладали мальчики (66,3 и 58,9% при СМ и ГМ соответственно). В группе сравнения количество мальчиков и девочек было приблизительно равным: при исследовании крови — 44,5% мальчиков и 55,5% девочек, при исследовании ликвора — 46% мальчиков и 54% девочек.

При СМ у 46 детей (54,7%) установлена энтеровирусная природа заболевания, в остальных случаях этиология не установлена. Из 39 детей с ГМ у 24 установлена менингококковая этиология, у 7 — гемофильная, у 7 — стрептококковая; у 1 ребенка этиология ГМ не установлена.

Кровь и ликвор больных исследовали в остром периоде (в течение первых 5 суток от начала болезни) и в периоде ранней реконвалесценции: через 12–15 дней при СМ и 6–13 дней при ГМ, у детей с ОРВИ — однократно в остром периоде заболевания. Забор крови для исследования субпопуляций лимфоцитов осуществляли в вакутейнеры с Li-гепарином. Ликвор, полученный при люмбальной пункции, отбирался в пластиковые пробирки без наполнителя. Исследование субпопуляционного состава крови и ликвора проводилось в день забора биологического материала, спустя не более 2–3 часов.

Стандартное исследование включало определение концентрации общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеарные лейкоциты (реагенты «Диахим-Ликвор», НПФ «Абрис+», Санкт-Петербург, Россия). Гематологические исследования выполнены на анализаторе Sysmex XP-300 (Япония). Иммунофенотипирование клеток крови и ликвора проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы MultiSET (Becton Dickinson, США) в автоматическом режиме.

Подготовку образцов крови и ликвора осуществляли согласно инструкции производителя: образцы ликвора центрифугировали в течение 5 минут при 1800 об/мин на центрифуге Heraeus Labofuge 300 (Thermo Scientific, США) и ресуспендировали осадок в 100 мкл ЦСЖ. Основные ($CD3^+$ Т-клетки, $CD3^+CD4^+$ Th, $CD3^+CD8^+$ CTL, $CD3^-CD19^+$ В-клетки, $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK) и малые субпопуляции ($CD3^+CD16^+CD56^+$ (NKT), $CD3^+CD4^-CD8^-$ (DN), $CD3^+CD4^+CD8^+$ (DP), $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^-CD8^+$ NK) идентифицировали с помощью тест-системы BD MultiTEST IMK Kit (кат. № 350503). Обработка данных выполнена в программе FlowJo с применением усовершенствованного способа анализа, позволяющего дополнительно выделять ряд малых субпопуляций лимфоцитов. Алгоритм гейтирования (gating), детально представленный в нашем предыдущем исследовании, был единым для клеток крови и ЦСЖ [4]. В его основу положено последовательное выделение основных и малых субпопуляций на основе характерных клеточных маркеров. Содержание основных и минорных субпопуляций рассчитано относительно числа всех лимфоцитов крови и ликвора с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартных программ GraphPad Prism 5. Результаты представлены по группам в зависимости от нозологической формы и периода заболевания в виде медианы и межквартильного размаха (Me , Q_{25} – Q_{75}). Для проверки гипотезы нормальности распределения использовали критерий Колмогорова. Для оценки достоверности различий выборок использованы непараметрический U-критерий Манна–Уитни, парный критерий Вилкоксона, критерий Фишера.

Результаты

Анализ содержания основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови детей при менингитах выявил различные отклонения от группы сравнения (табл. 1). Так, в остром периоде в группе детей с СМ обнаружено увеличение NK и NKT, снижение $CD4^+$ Th. В динамике содержание Т-клеток и $CD4^+$ Th в крови статистически значимо возрастало, В-лимфоцитов снижалось. При этом содержание $CD4^+$ Th оставалось значительно ниже, а NK, NKT, $CD3^+CD8^{dim}$ Т-клеток — выше показателей группы сравнения. Коэффициент Th/CTL во все периоды СМ был достоверно ниже. При ГМ в остром периоде заболевания в крови выявлено снижение содержания $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD4^+$ Th и $CD3^+CD8^{dim}$ Т-лимфоцитов относительно уровня показателей в группе сравнения. Напротив, доля $CD19^+$ В-клеток в крови более

чем вдвое превышала аналогичный показатель при ОРВИ. В динамике заболевания содержание $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD4^+$ Th, CTL и ее феноитов ($CD3^+CD8^{bright}$ и $CD3^+CD8^{dim}$), DP Т-клеток достоверно увеличивалось, а доля В-лимфоцитов сокращалась. Коэффициент Th/CTL в оба периода заболевания не отличался от показателя в группе сравнения.

В связи с наличием возрастных особенностей состава крови, полученные результаты рассматривались не только в целом по группам СМ и ГМ, но и в соответствии с возрастом согласно общепринятой классификации возрастных периодов развития человека. В группе с СМ дети были представлены в 3 возрастных подгруппах (2–5, 6–11, 12–18 лет), тогда как при ГМ в 4 (3–12 месяцев, 1–2 года, 2–5 и 6–11 лет). Данные о субпопуляционном составе лимфоцитов крови больных с СМ и ГМ сравнивали с литературными данными нормы у детей разного возраста, включающими только основные субпопуляции [33].

Анализ полученных данных субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей разного возраста с СМ не выявил существенных отличий от нормы ни в одной из возрастных подгрупп. Однако отмечено увеличение NKT-клеток с возрастом и тенденция к увеличению NK и снижению DN вне зависимости от периода заболевания.

При ГМ, так же как и в целом по группе, у детей разного возраста выявлено в остром периоде снижение Т-клеток, Th и увеличение содержания В-клеток по сравнению с возрастными показателями из литературных данных, с практической нормализацией к периоду реконвалесценции, а в возрастных группах 3–12 месяца, 1–2 года, 2–5 лет отмечено незначительное снижение NK-клеток по сравнению с литературной нормой как в остром периоде, так и в период реконвалесценции. При ГМ обнаружена тенденция к увеличению с возрастом относительного содержания Т-клеток, CTL, NK и большинства малых субпопуляций и снижению относительного содержания В-лимфоцитов.

При исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ выявлены отклонения от показателей группы сравнения, как при СМ, так и при ГМ (табл. 2). У больных СМ в остром периоде обнаружено увеличение содержания $CD4^+$ Th, NK и DN Т-клеток, снижение CTL и ее фенотипов ($CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD8^{bright}$), NKT и DP Т-клеток. Коэффициент Th/CTL в острый период СМ в ЦСЖ был почти в 2 раза выше аналогичного показателя у детей с ОРВИ. В динамике заболевания наблюдалось достоверное снижение $CD4^+$ Th, увеличение CTL, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^+CD8^{bright}$, DP Т-клеток и В-лимфоцитов, нормализация соотношения

Th/CTL. Однако содержание малых субпопуляций в ликворе (DP и DN T-клеток, NKT, CD3⁻CD8⁺ NK) достоверно отличалось от группы сравнения и в период реконвалесценции.

При ГМ в остром периоде заболевания в ЦСЖ выявлено существенное снижение CD3⁺ T-клеток, Th, CTL и ее субпопуляций, NKT и DP T-лимфоцитов при значительно большем количестве В-клеток, NK, CD3⁻CD8⁺ NK и DN T-лимфоцитов (табл. 2). Коэффициент Th/CTL был сопоставим с показателем детей с ОРВИ. В динамике заболевания обнаружено достоверное увеличение CD3⁺ T-клеток, CTL, CD3⁺CD8^{bright} T-клеток и снижение В-лимфоцитов по сравнению с острым периодом, однако содержание большинства субпопуляций оставалось отличным от этого же показателя в группе сравнения. Коэффициент Th/CTL в динамике ГМ достоверно снижался, при этом оставаясь сопоставимым с условным контролем.

Проведено также сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ детей разных возрастных групп, переносящих СМ и ГМ, с соответствующими показателями группы сравнения (2–5 лет, 6–11 лет и 12–18 лет), полученными нами ранее [4]. При СМ у детей разного возраста в сравнении с возрастной «нормой» выявлены те же закономерности, что и в целом по группе. При этом отмечено увеличение с возрастом Th и коэффициента Th/CTL и снижение содержания DN, аналогично группе сравнения. Уровень NK не отличался в разных возрастных группах, в то время как наблюдалось снижение уровня этих клеток с возрастом в группе сравнения [4].

При ГМ в связи с отсутствием в группе сравнения детей раннего возраста (3–12 месяцев, 1–2 лет) показатели субпопуляционного состава лимфоцитов ЦСЖ сравнивались с «нормой» только у детей 2–5 и 6–11 лет. В возрастных

Таблица 1. Относительное (%) содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей

Table 1. Percentage (%) of major and minor blood lymphocyte subsets in children with meningitis and acute respiratory viral infection (the comparison group)

Субпопуляции лимфоцитов, % Lymphocyte subsets, %	Содержание (%), Ме [Q ₂₅ –Q ₇₅] Percentage, Me [Q ₂₅ –Q ₇₅]				
	Группа сравнения (ОРВИ) The comparison group (ARVI) (n = 9)	Серозный менингит Aseptic meningitis		Бактериальный гнойный менингит Bacterial purulent meningitis	
		Острый период Acute period (n = 62)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 44)	Острый период Acute period (n = 24)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 26)
T-cells CD3 ⁺ CD45 ⁺	72,6 [68,6–80,9]	68,8 [59,7–74,1]	71,1 [67,6–74,8]**	50,7 [43,7–61,9]*,***	70,9 [62,7–76,9]**
Th CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺	45,7 [37,9–54,4]	35,5 [31,9–42,2]*	39,3 [34,8–43,8]**	30,9 [25,4–37,7]*,***	41,4 [34,7–48,0]**
CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺	22,3 [21,5–24,1]	24,4 [20,7–28,1]	26,2 [21,5–28,5]	16,0 [11,7–23,2]**	23,1 [17,2–28,5]**
NK CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺	6,0 [2,4–9,9]	9,1 [5,4–15,4]*	10,1 [6,1–12,7]*	3,2 [1,8–5,4]**	3,5 [1,4–5,7]**
B-cells CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺	16,9 [13,2–19,8]	20,1 [16,0–22,8]	16,0 [13,8–19,3]**	43,8 [29,1–52,4]*,***	21,5 [15,2–33,0]**,***
CD45⁺CD3⁻CD8⁺ NK	2,5 [0,8–3,5]	2,8 [2,0–6,5]	3,6 [2,1–5,8]	1,4 [0,8–1,9]**	1,3 [0,9–2,7]**
CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT	0,9 [0,4–2,2]	2,5 [1,7–3,5]*	2,2 [1,4–3,2]*	0,4 [0,2–1,4]**	0,8 [0,3–2,3]**
CD45⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻ DN	3,5 [2,5–5,7]	4,6 [3,5–6,6]	4,8 [3,6–6,5]	2,1 [1,3–4,6]**	3,0 [1,8–5,1]**
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DP	0,6 [0,5–1,4]	0,6 [0,5–0,9]	0,6 [0,5–0,9]	0,5 [0,3–0,8]	0,8 [0,6–1,2]**
CD45⁺CD3⁺CD8^{bright}	20,5 [19,2–22,2]	21,4 [18,0–25,0]	22,5 [18,2–24,8]	15,0 [10,5–22,0]**	20,7 [16,2–27,0]**
CD45⁺CD3⁺CD8^{dim}	3,0 [2,1–3,7]	3,8 [3,0–5,3]	3,9 [3,0–5,1]*	1,6 [1,1–2,3]*,***	2,3 [1,9–3,5]**
Th/CTL	2,1 [1,8–2,5]	1,5 [1,2–1,9]*	1,6 [1,2–1,9]*	2,0 [1,3–2,7]	1,7 [1,4–2,5]

Примечания. * — отличие от группы сравнения, ** — отличие показателей периода реконвалесценции от показателей острого периода, *** — отличие показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при серозном менингите.

Notes. * — significant difference from the comparison group, ** — significant difference between the recovery period and the acute period, *** — significant difference between bacterial purulent and aseptic meningitis.

подгруппах обнаружены те же закономерности в изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора, как и в целом по группе больных ГМ. Отмечено увеличение с возрастом в ликворе содержания Т-клеток, Th и существенное снижение содержания В-лимфоцитов в старших возрастных подгруппах (особенно в возрасте 6–11 лет), характерное для всех периодов заболевания.

Таким образом, рассмотрение динамики субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ЦСЖ в целом по группам детей, переносящих СМ и ГМ, и в подгруппах детей разного возраста выявило общие закономерности, что позволило в дальнейшем сопоставить основные группы пациентов между собой без разграничения по возрасту.

При сопоставлении относительного содержания основных и малых субпопуляций лимфо-

цитов крови и ликвора в остром периоде при СМ и ГМ выявлены существенные различия. Так, в крови больных СМ преобладали Т-клетки, Th, CTL, NK NKT, DN Т-лимфоциты, CD3⁺CD8⁺ NK, CD3⁺CD8^{bright} и CD3⁺CD8^{dim} Т-клеток при существенном снижении количества В-клеток по сравнению с ГМ (табл. 1). В ЦСЖ детей с СМ доля Т-клеток и Th превалировала, а доля В-клеток CD3⁺CD8⁺ NK была очень мала в сравнении с показателями при ГМ (табл. 2).

Для выявления особенностей интраклеточного и системного клеточного иммунного ответа проведены расчеты коэффициентов «ЦСЖ/кровь» для исследованных субпопуляций лимфоцитов у детей с менингитами и ОРВИ (табл. 3). В группе сравнения установлено превалирование в ЦСЖ большинства субпопуляций (коэффициенты варьировали от 1,2 до 16,4), за исключением В-клеток, NK

Таблица 2. Относительное (%) содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов цереброспинальной жидкости при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей
 Table 2. Percentage (%) of major and minor lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid in children with meningitis and acute respiratory viral infection (the comparison group)

Субпопуляции лимфоцитов, % Lymphocyte subsets, %	Содержание (%), Ме [Q ₂₅ -Q ₇₅] Percentage, Ме [Q ₂₅ -Q ₇₅]				
	Группа сравнения (ОРВИ) The comparison group (ARVI) (n = 28)	Серозный менингит Aseptic meningitis		Бактериальный гнойный менингит Bacterial purulent meningitis	
		Острый период Acute period (n = 82)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 41)	Острый период Acute period (n = 32)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 28)
T-cells CD3 ⁺ CD45 ⁺	95,9 [93,0–97,4]	95,7 [93,4–96,9]	94,8 [91,3–96,7]	79,5 [72,2–86,5]*, **	88,4 [83,7–93,8]*, **, ***
Th CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺	53,5 [47,5–61,5]	66,9 [59,6–71,3]*	53,5 [42,6–65,9]**	49,0 [31,3–54,7]*, **	51,1 [39,5–57,7]
CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺	27,9 [19,8–34,8]	17,1 [13,8–22,5]*	25,3 [19,2–29,7]**	19,0 [13,7–23,2]*	26,8 [20,7–31,7]**
NK CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺	2,1 [1,0–3,1]	3,3 [1,7–5,2]*	2,7 [1,7–4,7]	3,6 [2,1–7,4]*	3,8 [1,9–7,4]*
B-cells CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺	0,8 [0,3–1,8]	0,4 [0,2–1,2]	1,2 [0,6–3,1]**	12,8 [7,1–19,6]*, **	4,2 [1,7–6,8]*, **, ***
CD45⁺CD3⁺CD8⁺ NK	0,3 [0,0–1,2]	0,6 [0,3–1,0]	0,7 [0,4–1,2]*	0,8 [0,6–1,4]*, **	0,9 [0,6–1,9]*
CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT	10,1 [6,0–16,8]	4,1 [2,1–8,9]*	4,5 [2,4–8,7]*	3,7 [1,7–5,7]*	3,5 [1,9–6,6]*
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ DN	5,4 [2,5–8,6]	7,2 [5,3–11,6]*	7,5 [5,0–12,9]*	7,4 [4,2–11,0]	8,0 [5,5–10,0]*
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DP	4,2 [2,8–7,8]	1,2 [0,8–1,9]*	2,2 [1,3–3,9]*, **	1,6 [0,8–2,4]*	1,8 [1,2–2,9]*
CD45⁺CD3⁺CD8^{bright}	23,7 [16,2–32,7]	13,3 [11,1–18,8]*	20,5 [14,0–26,1]**	14,7 [11,6–22,3]*	24,4 [16,4–29,2]**
CD45⁺CD3⁺CD8^{dim}	8,1 [5,2–12,8]	4,1 [3,4–6,0]*	5,8 [4,2–8,3]**	4,8 [3,0–6,4]*	5,0 [3,9–6,0]*
Th/CTL	2,1 [1,8–2,5]	4,1 [2,5–4,9]*	2,0 [1,4–3,0]**	2,6 [1,5–3,4]	2,0 [1,2–2,4]**

Примечания. * — отличие от группы сравнения, ** — отличие показателей периода реконвалесценции от показателей острого периода, *** — отличие показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при серозном менингите.
 Notes. * — significant difference with the comparison group, ** — significant difference between the recovery phase and the acute period, *** — significant difference between bacterial purulent and aseptic meningitis.

и CD3⁻CD8⁺NK, количество которых в ЦСЖ было снижено по сравнению с кровью (коэффициенты варьировали от 0,07 до 0,31). При СМ в отличие от группы сравнения в остром периоде коэффициент «ЦСЖ/кровь» был выше для Th и DN T-лимфоцитов, ниже для CTL, NKT, CD3⁺CD8^{bright}, CD3⁺CD8^{dim} (табл. 3). При этом CTL- и CD3⁺CD8^{dim}-клеток в ЦСЖ становится меньше, чем в кровотоке. В период реконвалесценции СМ в сравнении с острым периодом происходят значительные изменения в распределении субпопуляций в биологических жидкостях: коэффициент «ЦСЖ/кровь» снижается для Т-клеток, Th и увеличивается для CTL, В-клеток, DP Т-клеток, CD3⁺CD8^{bright} и CD3⁺CD8^{dim}. Однако, несмотря на явную тенденцию к «нормализации», коэффициент «ЦСЖ/кровь» для NKT, DP и CD3⁺CD8^{dim} Т-клеток остается сниженным в сравнении с показателями при ОРВИ.

При ГМ соотношение основных и малых субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ и крови было заметно иным, чем при СМ и ОРВИ (табл. 3). Так, в ЦСЖ детей в остром периоде ГМ значительно увеличивался коэффициент для NK (в 9,7 раз по сравнению с ОРВИ, в 5,8 раз по сравнению с СМ) и CD19⁺ В-клеток (в 4,9 раз по сравнению с ОРВИ, в 17 раз по сравнению с СМ). Соотношение «ЦСЖ/кровь» для CTL было сопоставимо с показателем при ОРВИ и значительно выше, чем в острый период СМ (коэффициент 1,26 при ГМ против 0,73 при СМ). К периоду ранней реконвалесценции коэффициенты «ЦСЖ/кровь» приближались к показателям группы сравнения только для Т-клеточного звена, в то время как для NK и CD19⁺ В-клеток коэффициент оставался выше, а для большинства малых субпопуляций ниже. Следует отметить существенные различия в соотношении субпопуляций в ЦСЖ

Таблица 3. Соотношение содержания основных и малых субпопуляций лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови при менингитах и острой респираторной вирусной инфекции у детей

Table 3. Ratio of major and minor subsets of lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood in children with meningitis and acute respiratory viral infection (the comparison group)

Субпопуляции лимфоцитов Subsets of lymphocytes	Коэффициент «ЦСЖ/кровь», Me [Q ₂₅ -Q ₇₅]				CSF/blood ratio, Me [Q ₂₅ -Q ₇₅]	
	Группа сравнения (ОРВИ) The comparison group (ARVI) (n = 9)	Серозный менингит Aseptic meningitis		Бактериальный гнойный менингит Bacterial purulent meningitis		
		Острый период Acute period (n = 59)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 35)	Острый период Acute period (n = 20)	Фаза реконвалесценции Recovery period (n = 26)	
T-cells CD3 ⁺ CD45 ⁺	1,29 [1,18-1,41]	1,39 [1,28-1,55]	1,30 [1,23-1,41]**	1,55 [1,26-1,73]	1,23 [1,17-1,39]**	
Th CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺	1,38 [1,00-1,60]	1,75 [1,49-2,13]*	1,36 [1,05-1,66]**	1,50 [1,14-1,95]***	1,17 [0,90-1,43]**	
CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺	1,20 [0,76-1,49]	0,73 [0,55-0,87]*	1,03 [0,73-1,16]**	1,26 [0,84-1,77]***	1,18 [0,86-1,60]***	
NK CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺	0,21 [0,15-0,92]	0,35 [0,18-0,69]	0,34 [0,17-0,56]	2,04 [0,79-3,57]*, ***	0,83 [0,39-4,02]*, ***	
B-cells CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD45 ⁺	0,07 [0,02-0,23]	0,02 [0,01-0,06]	0,07 [0,04-0,21]**	0,34 [0,13-0,48]*, ***	0,19 [0,07-0,34]***	
CD45⁺CD3⁻CD8⁺ NK	0,31 [0,10-2,29]	0,19 [0,10-0,40]	0,17 [0,10-0,43]	0,85 [0,34-1,35]***	0,81 [0,25-1,57]***	
CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT	16,36 [3,55-39,72]	2,13 [0,72-4,19]*	1,91 [0,84-6,42]*	7,44 [2,07-32,69]***	5,08 [1,80-9,88]***	
CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ DN	1,17 [0,73-1,62]	1,73 [1,13-2,60]*	1,44 [1,05-2,60]	3,64 [2,37-7,17]*, ***	2,94 [1,42-5,05]*, ***	
CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺ DP	7,19 [5,71-18,40]	1,94 [1,18-2,89]*	3,98 [2,15-6,26]*, **	3,19 [2,22-4,09]*, ***	1,91 [1,33-3,60]*, ***	
CD45⁺CD3⁺CD8^{bright}	1,16 [0,80-1,50]	0,65 [0,51-0,86]*	1,00 [0,70-1,25]**	1,20 [0,75-1,72]***	1,07 [0,85-1,52]	
CD45⁺CD3⁺CD8^{dim}	2,72 [1,87-4,00]	1,12 [0,73-1,77]*	1,43 [1,12-1,74]*, **	3,24 [2,50-5,58]***	2,02 [1,47-3,79]**, ***	

Примечания. * — отличие от группы сравнения, ** — отличие показателей периода реконвалесценции от показателей острого периода, *** — отличие показателей при бактериальном гнойном менингите от показателей при серозном менингите.

Notes. * — significant difference from the comparison group, ** — significant difference between the recovery phase and the acute period, *** — significant difference between of bacterial purulent and aseptic meningitis.

и крови при СМ и ГМ в разные периоды заболевания. Полученные данные свидетельствуют о значимых различиях в содержании как основных, так и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ при серозном и гнойном менингите у детей.

Обсуждение

Использование в клинической лабораторной диагностике современного высокочувствительного метода проточной цитометрии существенно расширило возможности получения новых данных об иммунопатогенезе инфекционных заболеваний. Вирусные и, особенно, бактериальные менингиты представляют актуальную проблему в связи с тяжелым течением и формированием резидуальных неврологических последствий. В предыдущем исследовании авторами установлены существенные различия уровня основных популяций лимфоцитов крови и ликвора при СМ и ГМ [2]. В настоящем исследовании с применением дополнительного алгоритма гейтирования на основе имеющейся стандартной панели антител проведена оценка пропорций и динамики основных ($CD3^+$ Т-клеток, $CD3^+CD4^+$ Th, $CD3^+CD8^+$ CTL, $CD3^-CD19^+$ В-клеток, $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK) и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора (NKT, DN, DP, $CD3^+CD8^{bright}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^-CD8^+$ NK) у детей с СМ и ГМ.

В связи с невозможностью получения образцов ликвора здоровых детей в качестве группы сравнения использованы результаты исследования ликвора 28 детей, переносящих ОРВИ с менингеальными симптомами (без менингита) [4] и 9 образцов крови, полученных в сроки, близкие к люмбальной пункции (с разницей не более 1 дня). Результаты исследования субпопуляций крови при СМ и ГМ в зависимости от возраста сравнивались с литературными данными [33].

Полученные данные позволили охарактеризовать соотношение основных и малых субпопуляций лимфоцитов в крови и ЦСЖ в острую фазу вирусной инфекции без воспалительного процесса в ЦНС. Обнаружено значительно более высокое относительное содержание в ликворе (по сравнению с кровью) лимфоцитов основных субпопуляций — $CD3^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Th, а среди малых субпопуляций — NKT и DP Т-клеток, а также $CD3^+CD8^{dim}$ CTL, что можно объяснить экстренной миграцией этих клеток из кровотока в рамках механизма защиты ЦНС от вирусной экспансии. По-видимому, значительный прирост клеток этих субпопуляций в ЦСЖ характеризует эффективный иммунный ответ при системной вирусной инфекции, предотвращающий вовлечение в процесс ЦНС.

В таком случае более слабое перераспределение клеток данных субпопуляций у детей с менингитом может отражать недостаточность этого звена иммунной защиты, способствующую проникновению и репликации патогена в ЦНС.

Субпопуляции NKT, DP и DN Т-лимфоцитов известны сравнительно давно [6], но в последние десятилетия интерес к NKT и DP Т-клеткам возрос в связи с изучением их роли в патогенезе хронических воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний человека. Среди малых субпопуляций NKT-клетки являются на сегодняшний день наиболее изученными [1, 5, 23, 26, 30, 31, 32, 37]. Установлена их способность активировать созревание моноцитов в ответ на воздействие антигена [18]. Активированные NKT продуцируют большие количества цитокинов: $IFN\gamma$, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , которые модулируют активность $CD4^+$ Т-лимфоцитов, NK и В-клеток [23, 25, 26, 30, 31, 32]. С помощью своего Т-клеточного рецептора NKT-клетки прямо распознают необычные гликолипиды, которые присутствуют на поверхности ряда бактерий. Но даже в отсутствие микробных гликолипидов NKT-клетки могут активироваться под воздействием цитокинов, секретируемых дендритными клетками (ДК), которые первыми реагируют на патоген через свои Toll-подобные рецепторы. Это не прямое узнавание позволяет NKT-клеткам реагировать на широкий спектр возбудителей инфекций [36]. Показана их важная роль в иммунной защите от ряда бактерий, включая нейротропные *B. burgdorferi* и *S. pneumoniae* [29] (возбудитель пневмококкового менингита) [37]. NKT также вносят существенный вклад и в противовирусный иммунный ответ, хотя соответствующие липидные антигены еще не определены [14, 29].

В крови здоровых доноров число NKT колеблется от 0,5 до 6,0% [6]. В настоящей работе установлено максимальное содержание NKT в системном кровотоке в острой фазе СМ (2,5%), тогда как минимальное — в острой фазе ГМ (0,4%), что, возможно, свидетельствует об исходной недостаточности NKT-клеток у пациентов этой группы. Интересно отметить, что такие же различия мы обнаружили в отношении NK, с их максимальным уровнем в острой фазе СМ (9,1%) и минимальным в том же периоде ГМ (3,2%). Снижение относительного содержания NKT и NK в крови больных ГМ наблюдали также И.П. Балмасова и соавт., изучившие фенотипический состав лимфоцитов у взрослых пациентов с ГМ [3]. Можно предположить, что эти две субпопуляции клеток врожденного иммунитета действуют синхронно, осуществляя экстренную защиту от инфекционного агента за счет продукции «раннего» $IFN\gamma$ [7]. В ЦСЖ относительное количество NK

и НКТ в остром периоде ГМ было близко к таковому при СМ, однако число НК было достоверно выше (3,6% против 2,1%), а НКТ — гораздо ниже, чем у детей с ОРВИ (табл. 2). По данным И.П. Балмасовой и соавт. [3], в ликворе взрослых пациентов с ГМ и СМ показатели (%) НКТ (но не НК) также не различались, но проявлялась ассоциация повышенного содержания НКТ с осложненным течением ГМ.

Отчасти сходные тенденции мы наблюдали в отношении субпопуляции НК $CD3^-CD8^+$, доля которых в крови была при ГМ заметно ниже, чем при СМ (1,4% против 2,8%, $p = 0,1$), но в ЦСЖ более очевидно, чем при СМ, превышала уровень контроля в обе фазы ГМ (табл. 2).

Данные литературы касательно различных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих $CD8$, единичны. Так, J. Campbell и соавт. провели исследование разных $CD8^+$ субпопуляций лимфоцитов в крови здоровых молодых мужчин, подвергшихся интенсивным физическим нагрузкам [10]. С помощью метода проточной цитометрии авторы обнаружили, что в покое часть всех $CD8^+$ лимфоцитов крови ($25 \pm 17\%$) $CD3^-$ негативны, и представляют собой отдельную субпопуляцию $CD3^-CD8^{dim}CD16^+CD56^+$ НК. Был установлен значительный рост в крови относительного содержания $CD3^-CD8^+$ НК сразу после физических упражнений, в то время как содержание $CD3^+CD8^{bright}$ и $CD3^+CD8^{dim}$ Т-клеток не изменялось. Авторами не было выявлено существенных изменений содержания $CD3^-CD8^+$ НК в крови пациентов с СМ ни в острой фазе, ни в динамике заболевания. Однако у детей с ГМ в оба периода болезни отмечено снижение числа $CD3^-CD8^+$ НК в крови при заметном росте их числа в ликворе (относительно показателей при ОРВИ).

Показано, что в крови здоровых доноров субпопуляция $CD3^+CD8^{low}$ клеток составляет 0,2–7% от числа всех $CD3^+CD8^+$ Т-клеток [34]. Установлено накопление $CD3^+CD8^{low}$ Т-клеток в крови больных хроническим вирусным гепатитом В, при этом они отличались от таких же клеток в контроле более низкой экспрессией $IFN\gamma$ и более высокой — иммуносупрессивного цитокина $TGF-\beta$ [27]. У детей, перинатально инфицированных HIV-1, в циркуляции преобладали $CD8^{low}$ Т-клетки, которые *in vitro* слабо продуцировали $IFN\gamma$ в ответ на стимуляцию антигеном CMV (cytomegalovirus) [20]. В исследовании, проведенном в острой стадии ВИЧ (HIV)-инфекции у взрослых, был выявлен рост в крови субпопуляции $CD3^+CD8^{dim}$ Т-лимфоцитов, существенная часть которых были HIV-специфическими [13]. Данная субпопуляция в сравнении с $CD3^+CD8^{bright}$ Т-лимфоцитами характеризовалась низким потенциалом ингибирования репликации ви-

руса. Рост этой субпопуляции прямо коррелировал с вирусной нагрузкой и клиническими предикторами быстрого прогрессирования HIV-инфекции. Авторы связывают неэффективность ответа $CD8^+$ CTL при HIV-инфекции с ранней экспансией функционально неполноценных $CD3^+CD8^{dim}$ HIV-специфических Т-клеток. В нашем исследовании мы отметили заметный рост в циркуляции малой субпопуляции $CD3^+CD8^{dim}$ Т-лимфоцитов у детей с СМ (в обе стадии болезни), но не с ГМ.

Помимо НКТ-клеток в ликворе в острую фазу СМ и ГМ обнаружено сниженное (по сравнению с уровнем при ОРВИ) относительное содержание и других субпопуляций, обладающих цитотоксическим потенциалом (DP , $CD3^+CD8^{dim}$ и $CD3^+CD8^{bright}$), что соответствует более выраженному, чем при ОРВИ, перераспределению основных субпопуляций Т-лимфоцитов, с преимущественным накоплением в ЦСЖ $CD4^+$ Th, а при ГМ еще и $CD19^+$ В-клеток (табл. 1).

DP $CD4^+CD8^+$ Т-лимфоциты обнаружены в крови здоровых лиц, где они составляют 1–3% от общего числа Т-клеток. Показано, что $CD4^+CD8^+$ Т-клетки являются антиген-специфическими клетками памяти с функциями как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клеток: продуцируют цитокины Th1-типа и обладают цитотоксичностью на уровне $CD8^+$ CTL [5, 6]. Рост этой малой субпопуляции Т-клеток обнаружен при хронических вирусных инфекциях (EBV, HIV), некоторых аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваниях. Обнаружена значительная гетерогенность DP Т-клеток, выполняющих различные функции в зависимости от транскрипционных факторов, уровня экспрессии $CD4$ и $CD8$, возраста и настроек иммунной системы при разных болезнях [28]. Установлено активное участие субпопуляции DP Т-клеток в патогенезе острой HIV-инфекции, при которой DP Т-клетки высоко реагировали на стимуляцию HIV *in vitro*, независимо от основных субпопуляций антиген-специфических Т-клеток [15].

В противоположность субпопуляциям НКТ и DP Т-клеток у пациентов с СМ происходил рост (по сравнению с ОРВИ) относительного содержания DN Т-клеток и $CD3^-CD8^+$ НК как в крови, так и в ЦСЖ, что могло отражать их дополнительную мобилизацию. В остром периоде ГМ количество этих клеток в крови было сниженным, хотя в ликворе было заметно их накопление.

DN Т-лимфоциты изучены гораздо меньше, чем DP , но уже сейчас ясно, что эти клетки также являются важными участниками противовирусного или аутоиммунного ответа. Определен, например, высокий уровень транскрипции HIV в DN Т-клетках нелеченых пациентов с HIV-инфекцией, с исчезновением РНК вируса из этих

клеток после курса ретровирусной терапии [19]. Это позволило авторам предположить, что в продуктивном периоде HIV-инфекции DN Т-лимфоциты являются главным резервуаром вируса и могут происходить из инфицированных CD4⁺ Т-клеток из-за снижения экспрессии ими CD4. Однако в условиях аутоиммунного пролиферативного синдрома циркулирующие в крови DN Т-клетки, очевидно, происходят из клона CD8⁺ Т-клеток с утратой ими корцептора CD8 [9]. Ряд данных позволяет обозначить потенциально патогенную роль DN Т-клеток в аутоиммунной патологии и, напротив, гомеостатическую роль этих клеток в супрессии избыточного адаптивного Т-клеточного ответа с ослаблением его повреждающего действия [11]. R. Ahmed и соавт. [2014] установили, что число DN Т-лимфоцитов растет вскоре после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, причем в DN клетках определен набор экспрессии генов (включая ген IL-8), отличный от набора в CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцитах. Показано участие DN Т-клеток в иммунитете против вирусной инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (EBV), в качестве антиген-специфической эффекторной Т-клеточной субпопуляции [8]. В условиях аллотрансплантации органов DN Т-лимфоциты выполняют функции регуляторных Т-клеток (Treg) наряду с другими типами Treg, продлевая жизнь трансплантата через индукцию апоптоза, прямой лизис эффекторных Т-клеток или секрецию иммуносупрессивных цитокинов TGF-β и IL-10 [24]. Обнаруженный авторами в ЦСЖ больных СМ и ГМ (острый период) рост содержания DN Т-клеток, возможно, отражает механизм регуляции рекрутированных в ЦНС клеток адаптивного иммунного ответа.

К периоду реконвалесценции содержание малых субпопуляций лимфоцитов при СМ возросло за счет клеток с цитотоксической активностью (DP, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}), а при ГМ — за счет CD3⁺CD8^{bright} CTL. Хорошо известно, что системная генерация антиген-специфических CD8⁺ CTL требует значительно большего времени, чем CD4⁺ Th [6]. С другой стороны, такая динамика интрацеребрального состава лимфоцитов может отражать общие особенности иммунопатогенеза нейроинфекций, где в острый период заболевания в ЦНС доминирует регуляторное звено адаптивного иммунного ответа, с чем согласуется 2–3-кратное преобладание в ЦСЖ пациентов с СМ или ГМ основной субпопуляции CD4⁺ Th над CD8⁺ CTL. Доминирование в ЦСЖ субпопуляции CD4⁺ Th над CD8⁺ CTL неоднократно наблюдали при отсутствии патологии в ЦНС и многих неврологических заболеваниях (включая вирусные и бактериальные менингиты). По-видимому, CD4⁺ Т-лимфоциты обладают повышенной способ-

ностью преодолевать гематоэнцефалический барьер, что важно для поддержания гомеостаза иммунной системы мозга в физиологических условиях и при патологии ЦНС [17, 22].

Данные о преобладании в ЦСЖ детей с СМ и ГМ цитокин-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток дополняют результаты предыдущего исследования [2], в котором показан значительный рост концентраций IL-6 в ЦСЖ (по сравнению с кровью) у детей обеих групп, а также IL-4 (при СМ) или IL-10 (при ГМ) — цитокинов с противовоспалительными свойствами, характерных для CD4⁺ Th2 и CD4⁺ Treg соответственно.

Обобщая все изученные параметры, можно констатировать, что в остром периоде СМ и ГМ относительное содержание CD3⁺, CD4⁺ Т-лимфоцитов, а также клеток малых субпопуляций (NKT, DP и DN Т-клеток, а при ГМ и CD3⁺CD8^{dim} Т-клеток) значительно выше в ЦСЖ, чем в крови, что может свидетельствовать об участии этих субпопуляций в механизмах локальной иммунной защиты при менингитах у детей. Дифференциально-диагностическими признаками первой иммунограммы крови пациентов с ГМ (в сравнении с СМ и ОРВИ) может быть ряд следующих показателей: низкое относительное содержание CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов при двукратном росте числа CD19⁺ В-лимфоцитов, а также дефицит NK и большинства малых субпопуляций лимфоцитов — NKT, CD8⁺ NK, DN-Т-клеток, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright} CTL.

Заключение

При помощи метода проточной цитометрии с использованием дополнительного алгоритма гейтирования субпопуляций лимфоцитов охарактеризован состав основных и малых субпопуляций лимфоцитов (NKT, CD3⁺CD8⁺ NK, DP и DN, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright} Т-клеток) крови и ликвора у детей группы сравнения (ОРВИ), и детей, переносящих ГМ и СМ. Выявлены значимые различия между их содержанием в крови и ЦСЖ, что позволяет оценить взаимосвязь клеточного компонента системного и локального иммунного ответа и предположить патогенетическую роль исследованных популяций в развитии менингитов у детей. Обнаружены достоверные различия в относительном содержании основных и некоторых малых субпопуляций (NKT, CD3⁺CD8⁺ NK, DN, CD3⁺CD8^{dim} и CD3⁺CD8^{bright}) у детей с СМ и ГМ. Дальнейший поиск диагностического и прогностического значения оценки малых субпопуляций лимфоцитов в зависимости от этиологии и тяжести течения заболевания позволит уточнить иммунопатогенетические механизмы различных по этиологии инфекционных заболеваний ЦНС у детей.

Список литературы/References

1. Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // Онкогематология. 2010. Т. 5, № 4. С. 39–47. [Akinfieva O.V., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S. NKT cells: characteristic features and functional significance in immune response regulation. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 39–47. (In Russ.)]
2. Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Жирков А.А., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляции лимфоцитов и цитокины в крови и цереброспинальной жидкости при вирусных и бактериальных менингитах у детей // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 1. С. 33–44. [Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Zhirkov A.A., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Lymphocyte subsets and cytokines in blood and cerebrospinal fluid in children with viral and bacterial meningitis. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 33–44. (In Russ.)] doi: 0.15789/2220-7619-2016-1-33-44
3. Балмасова И.П., Венгеров Ю.Я., Раздобарина С.Е., Нагибина М.В. Иммунопатогенетические особенности бактериальных гнойных менингитов // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. Т. 19, № 5. С. 17–22. [Balmasova I.P., Vengerov Yu.Ya., Razdobarina S.E., Nagibina M.V. Immunopathogenetic features of bacterial purulent meningitides. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2014, vol. 19, no. 5, pp. 17–22. (In Russ.)]
4. Жирков А.А., Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляционный состав лимфоцитов цереброспинальной жидкости детей с острой респираторной вирусной инфекцией, протекающей с синдромом менингизма // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 6. С. 1033–1042. [Zhirkov A.A., Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Subsets of cerebrospinal fluid lymphocytes in acute pediatric respiratory viral infection with meningeal syndrome. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 6, pp. 1033–1042. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1033-1042
5. Хайдуков С.В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, Th9, Th22 и CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки) // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 6. С. 503–512. [Khaidukov S.V. Minor subsets of T-helpers (Th thymic naive, Th central naive, Th9, Th22 and CD4⁺CD8⁺ double positive T-cells. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 503–512. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-6-503-512
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса // Медицинский алфавит. 2015. Т. 2, № 8. С. 44–51. [Khaidukov S.V., Baydun L.V. Modern approach to assessing cellular constituents immune status. *Medicinskij alfavit = Medical Alphabet*, 2015, vol. 2, no. 8, pp. 44–51. (In Russ.)]
7. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)]
8. Ahmed R.K., Poiret T., Ambati A., Rane L., Remberger M., Omazic B., Vudattu N.K., Winiarski J., Ernberg I., Axelsson-Robertson R., Magalhaes I., Castelli C., Ringden O., Maeurer M. TCR⁺CD4⁺CD8⁻ T cells in antigen-specific MHC class I-restricted T-cell responses after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunother.*, 2014, vol. 37, no. 8, pp. 416–425. doi: 10.1097/CJI.0000000000000047
9. Bristeau-Leprince A., Mateo V., Lim A., Magerus-Chatinet A., Solary E., Fischer A., Rieux-Laucat F., Gougeon M.-L. Human TCR α/β ⁺ CD4⁺CD8⁻ double-negative t cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted V β TCR diversity and are clonally related to CD8⁺ t cells. *J. Immunol.*, 2014, vol. 181, no. 1, pp. 440–448. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.440
10. Campbell J.P., Guy K., Cosgrove C., Florida-James G.D., Simpson R.J. Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise. *Brain. Behav. Immun.*, 2008, vol. 22, no. 3, pp. 375–380. doi: 10.1016/j.bbi.2007.09.001
11. D'Acquisto F., Crompton T. CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem. Pharmacol.*, 2011, vol. 82, no. 4, pp. 333–340. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.019
12. Das G., Augustine M.M., Das J., Bottomly K., Ray P., Ray A. An important regulatory role for CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *PNAS*, 2003, vol. 100, no. 9, pp. 5324–5329. doi: 10.1073/pnas.0831037100
13. Eller M.A., Goonetilleke N., Tassaneetrithep B., Eller L.A., Costanzo C., Johnson S., Betts M.R., Krebs S.J., Slike B.M., Nitayaphan S., Rono K., Tovanabutra S., Maganga L., Kibuuka H., Jagodzinski L., Peel S., Rolland M., Marovich M.A., Kim J.H., Michael N.L., Robb M.L., Streeck H. Expansion of inefficient HIV-specific CD8⁺ T cells during acute infection. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 8, pp. 4005–4016. doi: 10.1128/JVI.02785-15
14. Fernandez C.S., Kelleher A.D., Finlayson R., Godfrey D.I., Kent S.J. NKT cell depletion in humans during early HIV infection. *Immunol. Cell Biol.*, 2014, vol. 92, no. 7, pp. 578–590. doi: 10.1038/icb.2014.25
15. Frahm M.A., Picking R.A., Kuruc J.D., McGee K.S., Gay C.L., Eron J.J., Hicks C.B., Tomaras G.D., Ferrari G. CD4⁺CD8⁺ T-cells represent a significant portion of the anti-HIV T-cell response to acute HIV infection. *J. Immunol.*, 2014, vol. 71, no. 11, pp. 3831–3840. doi: 10.4049/jimmunol.1103701
16. Giancchetti E., Vittorio D., Fierabracci A. NK cells in autoimmune diseases: linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun. Rev.*, 2018, vol. 17, no. 2, pp. 142–154. doi: 10.1016/j.autrev.2017.11.018
17. Graaf De M.T., Smitt P.A., Luitwieler R.L., Van Velzen C., Van Den Broek P.D., Kraan J., Gratama J.W. Central memory CD4⁺ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2011, vol. 80, no. 1, pp. 43–50. doi: 10.1002/cyto.b.20542
18. Hegde S., Chen X., Keaton J.M., Reddington F., Besra G.S., Gumperz J.E. NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 81, no. 5, pp. 1224–1235. doi: 10.1189/jlb.1206718
19. Kaiser P., Joos B., Niederost B., Weber R., Gunthard H.F., Fischer M. Productive human immunodeficiency virus type 1 infection in peripheral blood predominantly takes place in CD4/CD8 double-negative T lymphocytes. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 18, pp. 9693–9706. doi: 10.1128/JVI.00492-07

20. Keir M.E., Rosenberg M.G., Sandberg J.K., Jordan K.A., Wiznia A., Nixon D.F., Stoddart C.A., McCune J.M. Generation of CD3⁺CD8^{low} thymocytes in the HIV type 1-infected thymus. *J. Immunol.*, 2014, vol. 169, no. 5, pp. 2788–2796. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2788
21. Kitchen S.G., Jones N.R., LaForge S., Whitmire J.K., Vu B.A., Galic Z., Brooks D.G., Brown S.J., Kitchen C.M., Zack J.A. CD4 on CD8⁺ T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *PNAS*, 2004, vol. 101, no. 23, pp. 8727–8732. doi: 10.1073/pnas.0401500101
22. Kowarik M.C., Grummel V., Wemlinger S., Buck D., Weber M.S., Berthele A., Hemmer B. Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *J. Neurol.*, 2014, vol. 261, pp. 130–143. doi: 10.1007/s00415-013-7145-2
23. Kumar V., Terry L. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology*, 2014, vol. 142, no. 3, pp. 321–336. doi: 10.1111/imm.12247
24. Ligocki A.J., Niederkorn J.Y. Advances on non-CD4⁺Foxp3⁺ T regulatory cells: CD8⁺, type 1, and double negative T regulatory cells in organ transplantation. *Transplantation*, 2015, vol. 20, no. 2, pp. 163–178. doi: 10.1097/TP.0000000000000813
25. Lin H., Nieda M., Rozenkov V., Nicol A.J. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells. *Exp. Hematol.*, 2006, vol. 34, no. 3, pp. 289–295. doi: 10.1016/j.exphem.2005.12.008
26. Marrero I., Ware R., Kumar V. Type II NKT cells in inflammation, autoimmunity, microbial immunity, and cancer. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6, pp. 1–6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00316
27. Ouyang L., Li X., Liang Z., Yang D., Gong F. CD8^{low} T-cell subpopulation is increased in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol. Immunol.*, 2013, vol. 56, no. 4, pp. 698–704. doi: 10.1016/j.molimm.2013.07.003
28. 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
29. Rhost S., Sedimbi S., Kadri N., Cardell S.L. immunomodulatory type II natural killer T Lymphocytes in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2012, vol. 76, no. 3, pp. 246–255. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02750.x
30. Schönrich G., Raftery M.J. CD1-restricted T cells during persistent virus infections: “sympathy for the devil”. *Front Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2018.00545
31. Singh A.K., Tripathi P., Cardell S.L. Type II NKT cells: an elusive population with immunoregulatory properties. *Front Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01969
32. Torina A., Guggino G., Pio M., Manna L., Sireci G. The Janus face of NKT cell function in autoimmunity and infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, no. 440, pp. 1–10. doi: 10.3390/ijms19020440
33. Tosano F., Bucciol G., Pantano G., Putti M.C., Sanzari M.C., Basso G., Plebani M. Lymphocytes subsets reference value in childhood. *Cytometry Part A*, 2015, vol. 87, no. 1, pp. 81–85. doi: 10.1002/cyto.a.22520
34. Trautmann A., Ruckert B., Schmid-Grendelmeier E., Niederery P., Blaser K., Akdis C.A. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. *Immunol.*, 2003, vol. 108, no. 3, pp. 305–312. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01590.x
35. Tsunoda I., Tanaka T., Fujinami R.S. Regulatory role of CD1d in neurotropic virus infection. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 20, pp. 10279–10289. doi: 10.1128/JVI.00734-08
36. Tupin E., Kinjo Y., Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat. Rev.*, 2007, vol. 5, no. 6, pp. 405–417. doi: 10.1038/nrmicro1657
37. Zajonc D.M., Girardi E. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6, pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2015.00400
38. Zloza A., Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 79, no. 1, pp. 4–6. doi: 10.1189/jlb.0805455

Авторы:

Жирков А.А., младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Алексеева Л.А., д.б.н., руководитель и ведущий научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Железникова Г.Ф., д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Скрипченко Н.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой инфекционных болезней ФП

и ДПО Государственного педиатрического медицинского университета Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

Монахова Н.Е., научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Бессонова Т.В., научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Zhirkov A.A., Junior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Alekseeva L.A., PhD, MD (Biology), Head and Leading Researcher of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Zheleznikova G.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Skripchenko N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of Science, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Head of the Department of Infectious Diseases of Postgraduate and Continuing Professional Education SPbSPMU of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;

Monakhova N.E., Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

Bessonova T.V., Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВАКЦИНАЦИИ И УРОВНИ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ У ЛИЦ, РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ

О.С. Ермилова¹, З.И. Гинько², В.А. Белявская¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² МСЧ № 163 ФМБА, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме. Ликвидация заболеваемости натуральной оспой была достигнута за счет массовой вакцинации населения, которая затем была прекращена в связи с опасностью развития серьезных осложнений. Возрождение исследовательского интереса к осповакцине обусловлено возникшей угрозой применения вируса натуральной оспы в качестве оружия биотерроризма и возросшей частотой заражения ортопоксвирусными инфекциями на фоне неуклонного снижения популяционного иммунитета. Вирус осповакцины также используется в качестве вектора для создания рекомбинантных вакцин. Понимание механизмов формирования иммунного ответа и возможность его прогнозирования позволит избежать возможных осложнений и излишней иммунизации. Цель данной работы — выявление связи между уровнем гуморального иммунитета, клиническими показателями вакцинального периода и поло-возрастными характеристиками у лиц, ревакцинированных вирусом осповакцины. Были исследованы клинические данные вакцинального периода 135 человек, вакцинированных повторно от 2 до 10 раз. Поствакцинальные реакции легкой степени тяжести наблюдались у 95% обследованных, средней тяжести — у 5%. У 127 человек последовательно сформировались вакцинальные элементы (94,1%), у 22,2% были зафиксированы местные и общие осложнения. Для средней степени тяжести характерны большие размеры гиперемии ($p = 0,04$), корочки ($p = 0,01$) и большая продолжительность отпадения корочки ($p = 0,001$). Возраст обследованных лиц со средней степенью тяжести поствакцинальных реакций статистически значимо меньше, чем возраст лиц с легкой степенью ($p = 0,03$), при средней степени тяжести выше вероятность развития лимфаденита ($p < 0,001$). У 54 обследованных лиц был определен титр защитных антител (АТ) в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero по методу бляшек. У женщин, по сравнению с мужчинами, наблюдалась тенденция к формированию более высокого уровня АТ. Выявлена прямая отрицательная корреляция между титром АТ и размером гиперемии. Подмышечный лимфаденит чаще сопровождается высоким уровнем АТ. Корреляция между наличием и размерами вакцинальных элементов, временем отпадения корочки и титрами АТ не установлена. Возраст и число предшествующих вакцинаций не оказывают значимого влияния на уровень гуморального иммунитета. Вариативность клинической картины и иммунного ответа при применении одной вакцины и единой схемы вакцинации может быть объяснена генетическими различиями индивидов и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: вирус осповакцины, осложнения вакцинации, нейтрализующие антитела, осповакцинация, вакцинальные реакции, ортопоксвирусы.

Адрес для переписки:

Белявская Валентина Александровна
630559, Россия, Новосибирская область, п. п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (383) 336-47-00.
E-mail: belyavskaya_va@vector.nsc.ru

Contacts:

Valentina A. Belyavskaya
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (383) 336-47-00.
E-mail: belyavskaya_va@vector.nsc.ru

Для цитирования:

Ермилова О.С., Гинько З.И., Белявская В.А. Клинические показатели вакцинации и уровни вируснейтрализующей активности у лиц, ревакцинированных против натуральной оспы // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 123–130. doi: 10.15789/2220-7619-HIV-1337

Citation:

Ermilova O.S., Ghinko Z.I., Belyavskaya V.A. Humoral immunity, vaccination period and demographic characteristics of first immunized smallpox vaccine recipients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 123–130. doi: 10.15789/2220-7619-HIV-1337

HUMORAL IMMUNITY, VACCINATION PERIOD AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF FIRST IMMUNIZED SMALLPOX VACCINE RECIPIENTS

Ermilova O.S.^a, Ghinko Z.I.^b, Belyavskaya V.A.^a

^a State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Russian Federation

^b Medical and Sanitary Part No.163 of the Federal Medical and Biological Agency, Koltsovo, Russian Federation

Abstract. General vaccination of population with vaccinia virus led to the eradication of smallpox, then it was finished because of the danger of adverse events. The recurrence of research interest in smallpox vaccine is due to the research of using the virus as a weapon of bioterrorism and the increased frequency of orthopoxvirus infections whereas the population immunity decline. The vaccinia virus is also used as a vector for creating recombinant vaccines. Understanding the pathway and predicting the immune response it will be able to avoid possible adverse events and excessive immunization. The aim of the study was to assess the correlations between humoral immunity, clinical signs during a vaccination period, sex and age characteristics of adults who had received several doses of vaccinia virus. We studied a vaccination clinical data of 135 subjects revaccinated with a smallpox vaccine from twice to 10 times. A total of 95% and 5% vaccine recipients experienced mild or moderate vaccination period, respectively. Inoculation skin lesions was noted at 127 subjects (94.1%). Among them more than 22% vaccine recipients experienced local or systemic adverse events. Compared to mild group moderate group had larger hyperemia ($p = 0.04$), scab ($p = 0.01$), healing time ($p = 0.001$). The age subjects with a moderate vaccination period is less than mild ($p = 0.03$), the chance of lymphadenopathy development is higher within moderate vaccination period ($p < 0.001$). Vaccinia neutralizing antibody titers were determined for 54 subjects using plaque reduction neutralization tests. There was a noted tendency of higher protective antibody values at women compared with men. Negative correlation between the antibody titers and the hyperemia size was revealed. Frequently axillary adenopathy is associated with higher protective antibody values. Vaccinia neutralizing antibody titers value are not associated with the presence and size of the lesion, the scab falling time, age and the number of previous vaccinations. The clinical variability and the immune response using the same vaccine and the same pattern vaccination would be explained by individual genetic differences that should be further explored.

Key words: vaccinia virus, vaccination adverse events, neutralizing antibody, smallpox vaccination, vaccine response, orthopox viruses.

Введение

Массовая вакцинация населения вирусом осповакцины (ВОВ), инициированная ВОЗ, позволила взять под контроль распространение натуральной оспы (НО), а в 1980 г. объявить о ликвидации этого опасного высококонтагиозного заболевания на планете. Однако интерес исследователей к вакцине на основе ВОВ сохраняется до сих пор. Во-первых, вакцина обладает исключительной эффективностью: даже при единичном введении индуцируется длительный (более 50 лет) защитный иммунитет [16, 18], ВОВ может быть использован в качестве вектора при создании рекомбинантных вакцин против других инфекций, а также препаратов для онколитической и иммунотерапии [20]. Во-вторых, после прекращения вакцинации неуклонное снижение популяционного иммунитета повышает риск вспышек заболеваемости близкородственными ортопоксвирусами, а также НО в случае применения вируса в качестве биологического оружия или высвобождения его из мерзлотных грунтов. Такая эпидемиологическая ситуация привела к формированию в ряде стран групп «первого реагирования» из числа медицинских сотрудников и военнослужащих для ликвидации возможных последствий при массовом инфицировании НО [4, 17].

Необходимость широкого применения ВОВ ставит перед исследователями задачу оценки и сравнения иммуногенности, реактогенности и безопасности существующих вакцин, включая новые поколения. Зарубежные авторы выявляют зависимости между клиническими показателями эффективности вакцинации, уровнем уже существующих в организме антител, вероятностью возникновения осложнений. На показатели иммуногенности могут влиять расовые, гендерные и возрастные различия, которые следует учитывать при оценке эффективности и безопасности вакцинации [12]. Одним из основных факторов, влияющих на эти показатели, считаются генетические различия, обусловленные однонуклеотидным полиморфизмом в составе медиаторов — цитокинов, регулирующих воспалительные процессы в ответ на введение вакцины, и их рецепторов. Данная работа представляет собой один из этапов проведения подобных исследований на российской популяции. Ранее мы описали особенности вакцинального периода у впервые и повторно иммунизированных ВОВ лиц [1]. Цель настоящей работы — выявление взаимосвязи между уровнем гуморального иммунитета, клиническими показателями вакцинального периода и демографическими характеристиками в группах лиц, ревакцинированных ВОВ.

Материалы и методы

Группа исследуемых включала 135 человек: 87 мужчин и 48 женщин в возрасте от 27 до 69 лет. Данные о течении вакцинального процесса у лиц, привитых против натуральной оспы, были предоставлены МСЧ № 3 ФМБА России. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ президента РФ от 24.12.93 № 2288), а также согласно протоколу, утвержденному Этическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Вакцинальный период классифицировали по степеням тяжести по уровню гипертермии: легкая (температура тела до 38,0°C), средняя (температура тела от 38,1 до 39,0°C), тяжелая (температура тела более 39,1°C). При каждом контрольном осмотре фиксировались данные о вакцинальных элементах: размерах гиперемии, инфильтрации, пустулы и корочки, а также время отпадения корочки, отмечалось наличие подмышечного лимфаденита и других побочных эффектов.

Нейтрализующую активность антител (АТ) определяли путем титрования методом бляшек в культуре клеток Vero в 24-луночных планшетах [2]. В работе использовали вирус осповакцины (штамм ЛИВП), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово, Новосибирская область), в дозе 30–50 бляшкообразующих единиц (БОЕ на лунку). Перед проведением реакции сыворотку крови инактивировали нагреванием при температуре 56°C в течение 30 мин и готовили серию последовательных 2-кратных разведений до концентрации 1:128 в объеме 0,4 мл. В пробирки с разведениями сывороток вносили 0,4 мл рабочего разведения вируса, и помещали в термостат при температуре 37,0°C на 1 ч для нейтрализации. После инкубирования пробирки извлекали из термостата, в лунки 24-луночного планшета вносили по 0,2 мл из каждой пробирки со смесью сыворотки и вируса. В качестве контроля был использован инкубированный аналогичным образом нативный препарат вируса. Адсорбцию вируса на клеточном монослое проводили при 37,0°C в термостате в течение 30 мин. После чего в каждую лунку добавляли 0,8 мл поддерживающей среды Игла МЕМ с 2% сыворотки плода коровы, помещали в эксикатор и в термостат при температуре 37,0°C на 72 ч, затем подсчитывали количество бляшек в каждой лунке.

За величину бляшконеutralизующего титра (БНТ) антител принимали обратное разведение сыворотки, при котором отмечается

нейтрализация (подавление образования) БОЕ на 50% по сравнению с контролем. Среднегеометрические БНТ антител рассчитывали по методу Спирмена–Кербера с применением логарифмов обратных разведений сыворотки по основанию 2 (\log_2), выражали в двоичных логарифмах числа разведений сыворотки (\log_2 разведений). Величины показателей в группах представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение от среднего при 95%-ном уровне надежности, сравнение показателей проводилось с применением t -критерия Стьюдента с доверительной вероятностью 95% ($p < 0,05$) [3]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 7.

Результаты

Вакцинальный период был оценен по клиническим характеристикам у 135 человек, ревакцинированных ВОВ, соотношение мужчин и женщин составляло 1,81:1. Количество предыдущих вакцинаций варьировалось от 2 до 10. В исследуемой группе вакцинальный период легкой степени тяжести наблюдался у 126 человек, количество предыдущих вакцинаций составило от 2 до 10. Средняя степень тяжести вакцинального периода была у 7 человек с одной ревакцинацией. У 6 из них перерыв между первичной вакцинацией и ревакцинацией составил более 30 лет. У 2 человек не было ни вакцинальных элементов, ни температурной реакции на прививку.

Среди обследованных лиц формирование папулы, везикулы или пустулы наблюдалось у 127 человек (94,1%). У 20 человек не была зафиксирована пустула, были отмечены только папула или везикула (14,8%), у 4 человек на месте инокуляции наблюдались только гиперемия и инфильтрация (3%). На недомогание пожаловались 8 человек (5,9%), зуд в месте вакцинации беспокоил 11 человек (8,1%), болезненность в месте вакцинации была у 4 человек (3%), подмышечный лимфаденит наблюдался у 30 человек (22,2%).

Мы сравнили группы с легкой и средней степенями тяжести по возрастному, половому составу и клиническим показателям вакцинального периода. Были выявлены статистически значимые отличия в диаметре корочки ($p = 0,01$), длительности ее отпадения ($p = 0,001$), размере гиперемии ($p = 0,04$) и возрасте ($p = 0,03$). Подмышечный лимфаденит при средней степени тяжести наблюдается в 4,63 раза чаще, чем при легкой ($p < 0,001$). При средней степени тяжести отмечены большие размеры уплотнения (в 2,05 раза), чем при легком течении вакцинального периода. Результаты представлены в табл. 1.

У 54 ревакцинированных лиц был определен титр нейтрализующих АТ (соотношение мужчин и женщин — 1,84:1). За год до проводимого исследования было вакцинировано 19 человек, за 2 года — 16 человек, за 3 года — 17 человек, за 4 года — 2 человека. Среднее значение титра нейтрализующих АТ среди всех обследованных составило $6,31 \pm 1,28 \log_2$ БНТ. В группе с легкой степенью вакцинального периода титр составил $6,28 \pm 1,20 \log_2$ БНТ ($n = 51$), в группе со средней тяжестью — $6,65 \pm 3,60 \log_2$ БНТ ($n = 18$). С целью обнаружения корреляции между уровнем гуморального иммунитета и выраженностью клинических проявлений мы ранжировали обследуемых по показателям титров и разделили их на 3 группы. Первая группа в количестве 14 человек характеризовалась относительно низкими титрами АТ — $4,88 \pm 0,4445 \log_2$ БНТ. Во второй группе в количестве 26 человек средний показатель титров АТ составил $6,20 \pm 0,5434 \log_2$ БНТ. В третьей группе, включавшей 14 человек, были относительно высокие титры АТ — $7,95 \pm 0,87 \log_2$ БНТ. Для каждой группы были изучены клинические показатели вакцинального периода. Результаты представлены в табл. 2.

Рассматриваемые нами группы не имеют достоверных различий по возрасту. В группе 1 ко-

личество мужчин наибольшее (71,4%), в группе 3 — наименьшее (57,14%). Статистически значимые различия между группами 2 и 3 установлены по числу предыдущих вакцинаций ($p = 0,02$), при этом корреляция между титрами АТ, количеством предыдущих вакцинаций и временем, прошедшим после последней вакцинации, не выявлена. Различия в размерах вакцинальных элементов, времени отпадения корочки, наличии подмышечного лимфаденита, времени после предыдущей вакцинации между группами с разными уровнями защитных АТ не достигали статистической значимости ($p > 0,05$). Отмечена прямая отрицательная корреляция между титром АТ и размером гиперемии. Подмышечный лимфаденит наблюдался в группе 3 в 1,7 и 1,9 раз чаще, чем в группах 1 и 2 соответственно.

Обсуждение

Возможная перспектива проведения вакцинации с применением ВОВ определяет необходимость оценки иммуногенности и безопасности вакцин против ортопоксвирусных инфекций как для первичной, так и для повторных иммунизаций. Исторически сложилось так,

Таблица 1. Показатели вакцинального периода среди ревакцинированных лиц в группах с различной степенью реакции на вакцину

Table 1. The vaccination feature rates of various vaccination response grades among revaccinated subjects

Показатель Features	Во всей группе All subjects M±SD (n = 133)	Легкая степень реакции Mild reaction M±SD (n = 126)	Средняя степень реакции Moderate reaction M±SD (n = 7)
Возраст, лет Age, years	41,0±7,2	41,2±7,3**	37,6±4,2**
Количество мужчин/женщин Number of male/female	87/46	82/44	5/2
Количество предыдущих вакцинаций Number of previous vaccination	3,2±1,9	3,2±2,0	2±0
Диаметр пустулы, см Diameter of pustule, sm	0,8±0,3	0,8±0,3	1,0±0,3
Диаметр корочки, см Diameter of scab, sm	0,7±0,2	0,7±0,2*	1,1±4,9*
День отпадения корочки, сутки Scab detachment day, days	14±5,4 (9; 20)	13,6±4,9*	23,4±5,5*
Зона гиперемии, см Diameter of erythema, sm	2,0±1,3	1,86±1,0**	3,6±2,3**
Зона уплотнения, см Diameter of induration, sm	1,3±0,8	1,3±0,7	2,5±0,9
Подмышечный лимфаденит, количество лиц Lymphadenopathy, number	30 (22,55%)	23 (18,25%)*	6 (85,7%)*

Примечания. М — среднее значение показателя; SD — стандартное отклонение от среднего; n — количество вакцинированных лиц, у которых были выявлены измеряемые признаки, * — отличие между группами при $p \leq 0,01$, ** — отличие между группами при $p < 0,05$.

Notes. M — feature mean; SD — standard deviation; n — number of subjects; * — statistical significance at p-value $\leq 0,01$; ** — statistical significance at p-value $< 0,05$.

что эффективность проведенной вакцинации с применением ВОВ оценивают по клиническим признакам и по уровню нейтрализующих антител. Ревакцинацию считают успешной при развитии вакцинальных элементов: папулы, везикулы, пустулы или гиперемии и уплотнения (МУ 3.3.1.2044-06). Одновременно с развитием кожных элементов наблюдается и общая реакция организма: недомогание, головная боль, повышение температуры, местный лимфаденит. В нашем исследовании у 94,1% ревакцинированных лиц сформировались папулы, везикулы или пустулы. Схожие данные описаны в других популяционных группах: в исследовании Bossi Ph. и соавт. (2008), среди 226 представителей французской популяции, ревакцинированных ВОВ штамма Lister, наличие пустулы наблюдалось у 95,6% участников [4]. Saito T. и соавт. (2009), обследовав 1692 ревакцинированных взрослых, реиммунизированных LC16m8 в Японии, отметили формирование вакцинальных элементов у 86,6% [19]. Orr N и соавт. (2004), оценивая напряженность иммунного ответа после иммунизации ВОВ штамма Lister в выборке 159 человек из представителей военных сил Израиля, от-

мечает появление везикулы, пустулы, язвы или корочки у 60,8% [17].

В изучаемой нами группе у 22,2% всех ревакцинированных лиц отмечен подмышечный лимфаденит, в группе с вакцинальным периодом средней тяжести этот показатель достигал 85,7% (в 4,6 раза чаще, чем в группе с легкой степенью); другие симптомы беспокоили от 3,7 до 8% обследованных. Подобную клиническую картину описывают иностранные авторы: Bossi Ph. и соавт. (2008) указывают, что во французской популяции у 27% после ревакцинации отмечался один побочный эффект и более (локальный зуд, усталость, подмышечный лимфаденит) [4]. Orr N. и соавт. (2004) выявили, что у 67,1 и 22,4% обследованных имел место зуд и/или локальная болезненность соответственно, 29,1% жаловались на усталость [17].

Сравнивая группы легкой и средней степени тяжести вакцинального периода, можно отметить, что в группе средней тяжести корочки были больше по диаметру и отпадали позднее, а вакцинальный период чаще сопровождался лимфаденитом. Bossi Ph. и соавт. (2008), отмечали наличие прямой корреляции между раз-

Таблица 2. Клинические различия в группах с разными уровнями нейтрализующих АТ

Table 2. Clinical differences of groups with various levels of neutralizing antibody titers

Показатель Features	Вся группа All subjects M±SD (n = 54)	Группа 1 Group 1 M±SD (n = 14)	Группа 2 Group 2 M±SD (n = 26)	Группа 3 Group 3 (M±SD) (n = 14)
Титр АТ, log ₂ БНТ Antibody titers, log ₂ plaque-neutralizing titer	6,31±1,28	4,88±0,44	6,20±0,54	8,0±0,87
Возраст, лет Age, years	41,7±5,4	43,6±5,9	40,7±5,8	41,4±3,2
Число мужчин/женщин Number of male/female	35/19	10/4	17/9	8/6
Количество предыдущих вакцинаций Number of previous vaccination	3,3±2,2	3,1±2,14	3,7±2,6*	2,6±0,9*
Время после последней вакцинации, лет Time after last vaccination, years	2,0±0,9	1,93±0,83	2,11±0,95	2,0±0,96
День отпадения корочки, сутки Scab detachment day, days	14,3±5,4	14,6±6,9	13,8±4,7	15±4,9
Диаметр корочки, см Diameter of scab, sm	0,8±0,2	0,7±0,2	0,8±0,3	0,8±0,2
Диаметр пустулы, см Diameter of pustule, sm	0,8±0,3	0,8± 0,3	0,8± 0,3	0,7± 0,3
Зона гиперемии, см Diameter of erythema, sm	1,8±1,3	1,9±1,9	1,9±1,1	1,5±0,5
Зона уплотнения, см Diameter of induration, sm	1,3±0,7	1,17±0,7	1,4±0,8	1,4±0,8
Подмышечный лимфаденит, количество лиц Lymphadenopathy, number	13	3	5	5

Примечания. М — среднее значение показателя; SD — стандартное отклонение от среднего; n — количество вакцинированных лиц, у которых были выявлены измеряемые признаки; * — различие между группами при p < 0,05.

Notes. M — feature mean; SD — standard deviation; n — number of subjects; * — statistical significance at p-value < 0.05.

мером пустулы и наличием подмышечного лимфаденита после ревакцинации [4]. Средняя степень тяжести чаще наблюдается при первой ревакцинации или длительном перерыве между вакцинацией и ревакцинацией (более 30 лет, как в нашем исследовании).

Несмотря на стандартизацию процедуры оспопрививания, даже в однородных демографических группах выявляются различия по клиническим и иммунологическим показателям. В нашей работе была выявлена взаимосвязь между тяжестью вакцинального периода и размерами вакцинальных элементов, но корреляции между местной реакцией и титрами нейтрализующих АТ не наблюдалось. Кроме того, у 2 человек из исследованной нами группы не было реакции на ревакцинацию. Ряд зарубежных исследователей проводили работы по сравнению клинических реакций и иммунологических ответов при проведении иммунизации с применением ВОВ. Orr N. и соавт. (2004), оценивая интенсивность гуморального ответа после реиммунизации, выявили, что уровень существующих ранее антител оказывает значительное влияние на вакцинальную реакцию (клинические проявления и сероконверсию). В частности, самый низкий уровень предшествующих антител наблюдался у лиц, сформировавших везикулу или пустулу, выше уровень был при наличии корочки, еще выше — при наличии только гиперемии и/или инфильтрации. У лиц без вакцинальных элементов предыдущие титры были самыми высокими. При этом у части вакцинируемых лиц наблюдалась противоположная ситуация: отсутствие адекватного иммунного ответа на фоне формирования вакцинальных элементов [17]. Taub D.D. и соавт. (2008), отметили, что у 3 из 209 пациентов (1,4%) не было измеримого уровня нейтрализующих АТ (по реакции нейтрализации и ИФА) [18]. Orr N. и соавт. (2004) также описывают группу обследованных, которая ответила на прививку формированием вакцинальных элементов, но титр АТ не повысился (у 11 вакцинированных из 159 — по результатам ИФА, у 9 — по реакции нейтрализации).

Индивидуальная вариабельность иммунного ответа на вакцинацию в значительной степени обусловлена генетическими особенностями индивида [9, 11]. Были выявлены серьезные различия в уровне гуморального ответа между мужчинами и женщинами при изучении вирусных и бактериальных вакцин от гриппа, гепатита А и В, краснухи, кори, бешенства, желтой лихорадки, менингококковой и пневмококковой инфекций, дифтерии, столбняка и бруцеллеза [6]. Bhatia A. и соавт. (2014) отводят особую роль рецепторам гормонов на иммунных клетках, что влияет на высвобождение цитокинов,

определяющих половые различия по врожденной, гуморальной и клеточно-опосредованной реакции на вирусные вакцины [5]. При этом более высокие уровни антител чаще наблюдаются у женщин [8, 12], а более надежный клеточный иммунитет формируется у мужчин [14]. В исследованных нами группах имеющиеся различия не достигали статистической значимости, но можно отметить, что количество мужчин в группе с низким уровнем гуморального ответа было более высоким (71,4%), чем в группе с высоким уровнем АТ (57,14%). В то же время ряд авторов указывают на отсутствие различий между мужчинами и женщинами при изучении иммунного ответа среди ревакцинированных лиц [4, 17].

По результатам нашего исследования, количество предыдущих вакцинаций и время, прошедшее после последней иммунизации, не коррелирует с уровнем защитных АТ. Несколько авторов, изучая динамику изменения гуморального иммунитета при ревакцинации, показали, что уровень защитных АТ после введения ВОВ в течение нескольких недель после иммунизации находится на максимальном уровне, постепенно снижается в течение 3–5 лет, а затем остается стабильными в течение десятилетий [7, 11, 18]. Исследователи указывают, что чем меньше интервал между вакцинацией против оспы и тестированием сыворотки на уровень нейтрализующих АТ, тем более высокие показатели иммунного ответа определяются [13, 17]. В работе Taub D.D. и соавт. (2008) отмечается небольшое, но статистически значимое увеличение среднего титра (по результатам ИФА) после 2 или более прививок (по сравнению с одной вакцинацией). В отличие от результатов ИФА, при проведении реакции нейтрализации существенной разницы в уровне защитных АТ у тех, кто был вакцинирован один раз, и у тех, кто был вакцинирован неоднократно, выявлено не было [18].

Таким образом, мы провели анализ клинических показателей вакцинального периода и выборочно определили уровень нейтрализующей активности сывороток крови у лиц, ревакцинированных против НО. В исследованных нами группах поствакцинальные реакции легкой степени наблюдались у большинства исследованных, средняя степень тяжести была характерна для людей с первой ревакцинацией с перерывом после первичной вакцинации более 30 лет. Практически у всех обследованных были выявлены местные вакцинальные элементы. Более $\frac{1}{5}$ ревакцинированных лиц отмечали общие и местные реакции (недомогание, локальный зуд и/или болезненность, регионарный лимфаденит). Для средней степени тяжести характерны бóльшие диаметры гиперемии,

корочки и большее время отпадения корочки. Средняя степень тяжести в 4,63 раза чаще сопровождается подмышечным лимфаденитом, чем легкая. Зона гиперемии меньше при средних уровнях АТ, а зона уплотнения — при более низких уровнях АТ. Подмышечный лимфаденит чаще сопровождается высоким уровнем АТ. У женщин чаще чем у мужчин наблюдается высокий уровень АТ. Корреляция между количеством ревакцинаций и уровнем АТ выявлена не была. Учитывая тот факт, что все ревакцинированные получили одинаковую дозу вакцины по единой схеме в период от 1 до 4 лет перед проведением исследования, различия в клини-

ческой картине и в уровнях АТ могут быть объяснены индивидуальными особенностями организма, обусловленными генетическими различиями иммунных клеток и регулирующих их медиаторов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГНЦ ВБ «Вектор» Бакулиной Л.Ф., Сороченко С.А., Дадаевой А.А., Сальник В.Г., Шишкиной Л.Н., Полтавченко А.Г. за помощь в экспериментальной работе и обсуждении результатов.

Список литературы/References

1. Ермилова О.С., Гинько З.И., Белявская В.А., Кузубов В.И., Сергеев Ар.А., Горбатовская Д.О., Азаев М.Ш., Агафонов А.П., Воевода М.И., Сергеев А.Н. Анализ особенностей течения вагинального процесса у лиц, привитых оспенной живой вакциной, при первичной и повторных вакцинациях // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. № 1. С. 75–78. [Ermilova O.S., Gin'ko Z.I., Belyavskaya V.A., Kuzubov V.I., Sergeev A.A., Gorbatovskaya D.O., Azaev M.S., Agafonov A.P., Voevoda M.I., Sergeev A.N. Analysis of vaccinal process peculiarities in persons immunized with smallpox live vaccine in case of primary vaccination and revaccination. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2015, vol. 1, pp. 75–78. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2015-1-75-78
2. Зверев В.В., Бойченко М.Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 448 с. [Zverev V.V., Bojichenko M.N. Medical microbiology, virology and immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 448 p. (In Russ.)]
3. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976. 598 с. [Zachs L. Statistical Evaluation. Moscow: Statistics, 1976. 598 p. (In Russ.)]
4. Bossi P., Gay F., Fouzai I., Combadière B., Brousse G., Lebrun-Vignes B., Crance J.M., Autran B., Garin D. Demographic and clinical factors associated with response to smallpox vaccine in preimmunized volunteers. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 12: e4087. doi: 10.1371/journal.pone.0004087
5. Bhatia A., Sekhon H.K., Kaur G. Sex hormones and immune dimorphism. *The Scientific World Journal*, 2014, vol. 2014, 8 p. doi: 10.1155/2014/159150
6. Cook I.F. Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 29–30, pp. 3551–3555. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.054
7. Crotty S., Felgner P., Davies H., Glidewell J., Villarreal L., Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 10, pp. 4969–4973. doi: 10.4049/jimmunol.171.10.4969
8. Domínguez A., Plans P., Costa J., Torner N., Cardenosa N., Batalla J., Plasencia A., Salleras L. Seroprevalence of measles, rubella, and mumps antibodies in Catalonia Spain: results of a cross-sectional study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, vol. 25, no. 5, pp. 310–317. doi: 10.1007/s10096-006-0133-z
9. Gröndahl-Yli-Hannuksela K., Vahlberg T., Ilonen J., Mertsola J., He Q. Polymorphism of IL-10 gene promoter region: association with T cell proliferative responses after acellular pertussis vaccination in adults. *Immunogenetics*, 2016, vol. 68, no. 9, pp. 733–741. doi: 10.1007/s00251-016-0923-0
10. Johnson B.F., Kanatani Y., Fujii T., Saito T., Yokote H., Smith G.L. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *J. Gen. Virol.*, 2011, vol. 92, no. 10, pp. 2405–2410. doi: 10.1099/vir.0.034207-0
11. Hammarlund E., Lewis M.W., Hansen S.G., Strelow L.I., Nelson J.A., Sexton G.J., Hanifin J.M., Slifka M.K. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, no. 19, pp. 1131–1137. doi: 10.1038/nm917
12. Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Vierkant R.A., Jacobson R.M., Ryan MA, Poland G.A. Gender effects on humoral immune responses to smallpox vaccine. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 25–26, pp. 3319–3323. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.086
13. Kim N.H., Kang Y.M., Kim G., Choe P.G., Song J.S., Lee K.H., Seong B.L., Park W.B., Kim N.J., Oh M.D. An open-label, single arm, phase III clinical study to evaluate the efficacy and safety of CJ smallpox vaccine in previously vaccinated healthy adults. *Vaccine*, 2013, vol. 31, no. 45, pp. 5239–5242. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.08.071
14. Klein N.P., Holmes T.H., Sharp M.A., Heineman T.C., Schleiss M.R., Bernstein D.I., Kemble G., Arvin A.M., Dekker C.L. Variability and gender differences in memory T cell immunity to varicellazoster virus in healthy adults. *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 33–34, pp. 5913–5918. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.060
15. Kwanchum K., Ampol S., Thongput A., Horthongkham N., Udomphuntharak S., Siritantikorn S., Kantakamalaku W. Duration of neutralizing antibody persisting in Thai individuals after childhood vaccination against smallpox. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2017, vol. 35, no. 4, pp. 239–243. doi: 10.12932/AP0857
16. Liu Q., Huang W., Nie J., Zhu R., Gao D., Song A., Meng S., Xu X., Wang Y. A novel high-throughput vaccinia virus neutralization assay and preexisting immunity in populations from different geographic regions in China. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 3. doi: 10.1371/journal.pone.0033392
17. Orr N., Forman M., Marcus H., Lustig S., Paran N., Grotto I., Klement E., Yehezkeili Y., Robin G., Reuveny S., Shafferman A., Cohen D. Clinical and immune responses after revaccination of Israeli adults with the lister strain of vaccinia virus. *J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 190, no. 7, pp. 1295–1302. doi: 10.1086/423851

18. Taub D.D., Ershler W.B., Janowski M., Artz A., Key M.L., McKelvey J., Muller D., Moss B., Ferrucci L., Duffey P.L., Longo D.L. Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study. *Am. J. Med.*, 2008, vol. 121, no. 12, pp. 1058–1064. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.08.019
19. Saito T., Fujii T., Kanatani Y., Saijo M., Morikawa S., Yokote H., Takeuchi T., Kuwabara N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA*, 2009, vol. 103, no. 10, pp. 1025–1033. doi: 10.1001/jama.2009.289
20. Verardi P.H., Titong A., Hagen C.J. A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, vol. 8, no. 7, pp. 961–970. doi: 10.4161/hv.21080

Авторы:

Ермилова О.С., младший научный сотрудник, ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирской область, Россия;
Гинько З.И., врач-инфекционист высшей категории МСЧ № 163 ФМБА России, п. Кольцово, Новосибирской область, Россия;
Белявская В.А., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирской область, Россия.

Authors:

Ermilova O.S., Junior Researcher, State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russian Federation;
Ghinko Z.I., Infectious Disease Physician, Medical Sanitary Station No. 163, Russian Federal Medical and Biological Agency, Koltsovo, Russian Federation;
Belyavskaya V.A., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Researcher, State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.12.2019
Отправлена на доработку 28.01.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 07.12.2019
Revision received 28.01.2020
Accepted 11.03.2020

ИММУНИТЕТ К КОКЛЮШУ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С СЕРОНЕГАТИВНЫМ СТАТУСОМ

Е.А. Кригер, О.В. Самодова, Л.В. Титова

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск, Россия

Резюме. Несмотря на высокий охват вакцинацией, коклюш по-прежнему остается серьезной проблемой современной медицины. Случаи заболевания регистрируются у детей, подростков и взрослых. Младенцы первых трех месяцев жизни – группа высокого риска тяжелого течения коклюша. Антитела, полученные трансплацентарно, обеспечивают защиту от инфекции. Но имеющиеся данные об уровне антител к коклюшу у беременных женщин в России носят фрагментарный характер. С целью оценки гуморального иммунитета к *Bordetella pertussis* у беременных женщин, а также факторов, ассоциированных с серонегативным статусом, проведено поперечное исследование с включением 388 участниц. Набор реагентов SeroPertussis IgG (Savyon Diagnostics, Израиль) для иммуноферментного анализа использовался для количественного определения уровня антител к коклюшному токсину/гемагглютину. Логистический регрессионный анализ для бинарной переменной отклика проводился для выявления факторов, ассоциированных с серонегативным статусом. Медиана возраста участниц исследования составила 30 лет. Более половины обследованных женщин (51,3%) не предоставили документально подтвержденной информации о вакцинации против коклюша. Положительный (защитный) титр антител к коклюшу (10–50 СвЕд/мл) был обнаружен в венозной крови 46,9% беременных женщин. У 25,8% серопозитивных женщин специфические антитела определялись в высоком титре (> 50 СвЕд/мл). Это может косвенно свидетельствовать о недавно перенесенном коклюше. Более половины обследованных женщин (53,1%) не имели защитного титра антител и были восприимчивы к инфекции. Их дети не получили трансплацентарного иммунитета к коклюшу. Срок гестации оказался фактором, ассоциированным с серонегативным статусом. В сравнении с женщинами, обследованными в первом триместре, участницы, обследованные в третьем триместре беременности, чаще были серонегативными к коклюшу. Шансы быть восприимчивой к инфекции возрастали с увеличением срока беременности, p для линейного тренда < 0,01. Возраст, количество беременностей и вакцинальный статус не влияли на серологический статус женщины. Введение возрастных ревакцинаций против коклюша для детей дошкольного возраста, подростков и медицинского персонала, работающего с беременными женщинами и новорожденными детьми, проведение кокон-иммунизации и вакцинации беременных женщин необходимы для защиты младенцев от коклюша.

Ключевые слова: иммунитет, коклюш, беременные, вакцинация, антитела, серопревалентность.

PERTUSSIS IMMUNITY IN PREGNANT WOMEN AND FACTORS ASSOCIATED WITH SERONEGATIVE STATUS

Krieger E.A., Samodova O.V., Titova L.V.

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation

Abstract. Despite high level of vaccination coverage, pertussis remains a serious problem of modern medicine. Pertussis cases are registered among infants, adolescents, and adults. Infants younger than three months of age have the highest rate

Адрес для переписки:

Кригер Екатерина Анатольевна
163000, Россия, г. Архангельск, Троицкий пр., 51,
Северный государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (950) 963-57-11 (моб.). E-mail: kate-krieger@mail.ru

Contacts:

Ekaterina A. Krieger
163000, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitski pr., 51,
Northern State Medical University.
Phone: +7 (950) 963-57-11 (mobile). E-mail: kate-krieger@mail.ru

Для цитирования:

Кригер Е.А., Самодова О.В., Титова Л.В. Иммунитет к коклюшу у беременных женщин и факторы, ассоциированные с серонегативным статусом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 131–136. doi: 10.15789/2220-7619-ITP-1406

Citation:

Krieger E.A., Samodova O.V., Titova L.V. Pertussis immunity in pregnant women and factors associated with seronegative status // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 131–136. doi: 10.15789/2220-7619-ITP-1406

of serious clinical pertussis course. Transplacental transfer of pertussis-specific antibodies induce protection against infection. The available data regarding anti-pertussis antibody level in pregnant women in Russia remain sparse. To evaluate the humoral immunity to *Bordetella pertussis* in pregnant women and factors associated with seronegative status, we performed a cross-sectional study with 388 participants. SeroPertussis IgG (Israel) ELISA kit was used to quantitate antibodies against pertussis toxin/hemagglutinin. Binary logistic regression analysis was performed to assess factors associated with seronegative status. The median age of the subjects was 30 years old, more than half of which (51.3%) provided no verified pertussis vaccination data so that their children will not receive transplacental anti-infectious immunity. Gestational age was significantly associated with seronegative status. Compared to women tested during the first trimester, participants in the third trimester of pregnancy were more likely to be seronegative against pertussis. The odds of being susceptible rose with increased gestational period ($p < 0.01$ for linear trend). Age, number of pregnancies and vaccination status revealed no impact on significant differences between seropositive and seronegative subjects. Pertussis booster vaccinations for pre-school children, adolescents and healthcare workers dealing with pregnant women and neonates as well as cocoon vaccination strategy and vaccination during pregnancy were necessary to be implemented to protect infants against pertussis.

Key words: immunity, pertussis, pregnancy, vaccination, antibodies, seroprevalence.

Введение

В начале XX века на первом году жизни от коклюша умирало больше детей, чем от кори, дифтерии и скарлатины [21]. Если бы Жюль Борде, бельгийский врач и ученый, который впервые выделил возбудителя из мокроты своей пятилетней дочери, страдавшей коклюшем, был жив сегодня, он бы гордился тем, что за последние несколько десятилетий миллионы жизней были спасены благодаря вакцинопрофилактике коклюша. Однако, несмотря на высокий охват вакцинацией, даже в таких странах как Австралия, Канада, Финляндия, Франция, Германия, Италия, Япония, Испания, Швейцария, США и Великобритания, коклюш до сих пор остается серьезной проблемой и регистрируется у детей, подростков и взрослых. Большая часть летальных исходов (83%) приходится на детей первых трех месяцев [2, 13]. Эпидемиологическая ситуация в Российской Федерации (РФ) сопоставима с другими странами, заболеваемость имеет тенденцию к росту, но летальные случаи регистрируются редко. Так, по данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в 2018 г. только 1 случай коклюша закончился неблагоприятным исходом [4].

Согласно Национальному календарю профилактических прививок (приказ МЗ РФ № 125-н от 2014 г.), ревакцинация против коклюша проводится на втором году жизни. С возрастом поствакцинальный иммунитет утрачивается, что ведет к увеличению заболеваемости представителей старших возрастных групп, которые являются источником инфекции для детей, не привитых против коклюша [5, 6]. В окружении заболевшего ребенка более чем в 80% случаев выявляется длительно кашляющий родственник, выделяющий *Bordetella pertussis* [23]. Причем коклюш считается гораздо более заразным, чем полиомиелит, ветряная оспа, краснуха, паротитная инфекция и дифтерия. Исследования показали, что один

инфицированный человек может заразить 12–17 восприимчивых к коклюшу людей [13]. Наиболее уязвимы в отношении коклюша дети раннего возраста, поскольку заболевание у них протекает особенно тяжело с развитием апноэ, судорог, поражением головного мозга гипоксического генеза. В 4% случаев заболевание коклюшем ребенка в возрасте до 3 месяцев заканчивается летальным исходом [3, 22]. Единственной защитой для детей первых месяцев жизни служат антитела, полученные от матери трансплацентарно [7, 14, 19]. Исследования, проведенные за рубежом, показали, что менее 50% родильниц имеют защитные антитела к коклюшу. Установлено, что в крови новорожденных от матерей с защитным титром антител против коклюша также определяется высокая концентрация антител к возбудителю, что обуславливает невосприимчивость детей к коклюшу в течение первых месяцев жизни [11, 18]. Таким образом, отсутствие ревакцинации детей старшего возраста и взрослых приводит не только к появлению большого числа восприимчивых к коклюшу лиц, потенциальных источников инфекции, но и не позволяет обеспечить защиту детей раннего возраста путем передачи пассивного иммунитета от матери ребенку.

Данные по напряженности иммунитета к коклюшу у беременных женщин в РФ представлены фрагментарно, что послужило предпосылкой для проведения данного исследования.

Цель настоящего исследования — оценка гуморального иммунитета к *Bordetella pertussis* у беременных женщин, а также факторов, ассоциированных с серонегативным статусом.

Материалы и методы

Проведено поперечное исследование с включением 388 беременных женщин. После подписания информированного согласия у женщины забиралась венозная кровь для определения концентрации антител к *Bordetella pertussis*. Процедура проводилась одновременно с рутинным обследова-

дованием беременных в женской консультации или родильном доме, дополнительных инвазивных вмешательств не требовалось. Исследование было одобрено комитетом по этике Северного государственного медицинского университета (протокол № 08/11-18 от 28.11.18). Участницы также заполняли опросник с указанием возраста, количества беременностей, срока настоящей беременности и данных о вакцинации против коклюша (документально подтвержденной).

Определение уровня антител (IgG) к коклюшному токсину/гемагглютинирующему проводилось в центральной научно-исследовательской лаборатории Северного государственного медицинского университета методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов SeroPertussis IgG (Savyon Diagnostics, Израиль). Результат обследования расценивался как положительный при концентрации антител в диапазоне от 10 до 50 СвЕд/мл (условно защитный титр), как отрицательный – при концентрации IgG ниже 10 СвЕд/мл. Уровень IgG более 50 СвЕд/мл указывал на недавно перенесенную инфекцию.

Качественные признаки представлены в абсолютных величинах с указанием частот (%). Анализ качественных признаков проводился с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. Нормальность распределения количественных данных определялась по критерию Колмогорова–Смирнова. В качестве способа их представления выбрана медиана (1-й и 3-й квартили) — Me (Q1; Q3).

Оценка факторов, потенциально влияющих на уровень антител к коклюшу в крови беременной женщины, проводилась с использованием множественного логистического регрессионного анализа для бинарной переменной отклика. Серологический статус женщины был введен в регрессионную модель как зависимая дихотомическая переменная (1 — серонегативный, 0 — серопозитивный). В качестве факторов, влияющих на концентрацию противокклюшных антител, рассматривались возраст, количество беременностей, срок настоящей беременности, вакцинальный статус. При проведении анализа учитывалось как изолированное влияние предиктора (нескорректированное отношение шансов [ОШ]), так и взаимное влияние совокупности изучаемых факторов (скорректированное ОШ). Расчеты проводились с помощью пакета статистических программ SPSS (версия 23; IBM, США).

Результаты

Возраст участниц исследования варьировался от 18 до 45 лет, медиана составила 30 (26; 34) лет. Срок беременности был от 5 до 41 недели

и в среднем составил 30 (12; 39) недель. Более половины обследованных женщин (62,4%) вынашивали вторую и последующие беременности. Сведения о вакцинации против коклюша, полученной в детстве, предоставили 48,7% женщин. С момента проведения прививки прошло в среднем 28 (23; 32) лет. Более детальная характеристика исследуемой группы представлена в табл. 1.

Положительный титр антител IgG к *Bordetella pertussis* был обнаружен в крови 46,9% беременных женщин. У 25,8% серопозитивных женщин специфические антитела определялись в высоком титре (> 50 СвЕд/мл), что может косвенно свидетельствовать о недавно перенесенном коклюше. Более половины обследованных женщин (53,1%) не имели защитного титра антител, следовательно, были восприимчивы к инфекции.

Доля серонегативных к коклюшу различалась в зависимости от возраста и срока беременности и была наибольшей у женщин старше 30 лет, а также у беременных, обследованных на сроке 38–41 неделя (табл. 1). Процент участниц исследования с низким уровнем противокклюшных антител был несколько выше среди женщин с пятью и более беременностями в анамнезе, при уровне статистической значимости $p = 0,05$. Зависимости концентрации IgG к возбудителю коклюша от вакцинального статуса выявлено не было (табл. 1).

С помощью множественного логистического регрессионного анализа проведена оценка факторов, потенциально влияющих на серологический статус беременной женщины относительно коклюша. В модель логистической регрессии были включены возраст, срок беременности, количество беременностей, вакцинация против коклюша в детстве. По результатам анализа только срок беременности оказывал статистически значимое влияние на серологический статус беременной женщины. С увеличением срока беременности шансы быть серонегативным к *Bordetella pertussis* увеличивались, p для тренда < 0,01. Так, на 38–41 неделе беременности вероятность иметь низкий уровень противокклюшных антител была выше (табл. 2).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что более половины беременных женщин были серонегативны по отношению к возбудителю коклюша, а, следовательно, их дети не получили пассивного иммунитета к коклюшу от матери. Среди факторов, влияющих на серологический статус беременной женщины относительно *Bordetella pertussis*, значимым был только срок гестации. Уровень антител снижался с увеличением срока беременности и был минимальным у женщин,

Таблица 1. Характеристика исследуемой группы, n = 388

Table 1. Characteristics of study population, n = 388

Характеристики Characteristics	Серопозитивные, N (%) Seropositive	Серонегативные, N (%) Seronegative	Всего, N (%) Total	Значение p* p-value
Возраст/Age				
18–25 лет/years	39 (43,8)	50 (56,2)	89 (100,0)	0,02
26–30 лет/years	67 (57,3)	50 (42,7)	117 (100,0)	
> 30 лет/years	76 (41,8)	106 (58,2)	182 (100,0)	
Срок беременности/Gestational period				
1–12 недель/weeks	60 (60,0)	40 (40,0)	100 (100,0)	< 0,01
13–27 недель/weeks	47 (61,8)	29 (38,2)	76 (100,0)	
28–37 недель/weeks	45 (60,8)	29 (39,2)	74 (100,0)	
38–41 неделя/weeks	30 (21,7)	108 (78,3)	138 (100,0)	
Количество беременностей/Gravidity				
1	69 (55,2)	56 (44,8)	125 (100,0)	0,05
2–5	106 (43,8)	136 (56,2)	242 (100,0)	
> 5	7 (33,3)	14 (66,7)	21 (100,0)	
Сведения о вакцинации против коклюша/Vaccination status of pertussis				
Вакцинированы/Vaccinated	82 (43,4)	107 (56,6)	189 (100,0)	0,18
Нет сведений/No data	100 (50,3)	99 (49,7)	199 (100,0)	

Примечание. * — хи-квадрат Пирсона.

Note. * — Pearson's Chi-square test.

Таблица 2. Факторы, ассоциированные с серонегативным статусом к коклюшу у беременных женщин

Table 2. Variables associated with seronegative status to pertussis among pregnant women

Факторы Variables	Нескорректированное ОШ* (95% ДИ**) Crude OR* (95% CI**)	Значение p p-value	Скорректированное ОШ (95% ДИ) Adjusted OR (95% CI)	Значение p p-value
Возраст/Age				
18–25 лет/years	группа сравнения reference	–	группа сравнения reference	–
26–30 лет/years	0,6 (0,3–1,0)	0,06	0,6 (0,3–1,1)	0,09
> 30 лет/years	1,1 (0,6–1,8)	0,75	1,0 (0,5–1,9)	0,98
Оценка тренда p for trend	–	0,40	–	0,19
Срок беременности/Gestational period				
1–12 недель/weeks	0,2 (0,1–0,3)	< 0,01	0,2 (0,1–0,3)	< 0,01
13–27 недель/weeks	0,2 (0,1–0,3)	< 0,01	0,2 (0,1–0,3)	< 0,01
28–37 недель/weeks	0,2 (0,1–0,3)	< 0,01	0,2 (0,1–0,3)	< 0,01
38–41 неделя/weeks	группа сравнения reference	–	группа сравнения reference	–
Оценка тренда p for trend	–	< 0,01	–	< 0,01
Количество беременностей/Gravidity				
1	группа сравнения reference	–	группа сравнения reference	–
2–5	1,5 (1,1–2,4)	0,04	1,6 (0,9–2,7)	0,08
> 5	2,5 (0,9–6,5)	0,07	1,9 (0,6–5,6)	0,26
Оценка тренда p for trend	–	0,02	–	0,08
Сведения о вакцинации против коклюша/Vaccination status of pertussis				
Вакцинированы Vaccinated	1,3 (0,9–2,0)	0,18	1,4 (0,9–2,3)	0,08
Нет сведений No data	группа сравнения reference	–	группа сравнения reference	–

Примечание. *ОШ — отношение шансов, **ДИ — доверительные интервалы.

Note. *OR — odds ratio, **CI — confidence intervals.

обследованных на 38–41 неделе. Возраст, количество беременностей и вакцинальный статус не влияли на концентрацию иммуноглобулинов класса IgG к возбудителю коклюша.

Доля серонегативных беременных женщин (53,1%) в нашем исследовании сопоставима с данным показателем в исследованиях, проведенных в Китае (61,3%) и Иране (64,2%), но процент серонегативных в нашем исследовании был меньше, чем в исследовании, проведенном в Италии (77,4%) [10, 16, 17]. Защитный титр отмечен у 46,1% беременных, что более характерно для эпохи до начала вакцинации против коклюша, когда в результате естественной инфекции происходило формирование иммунной прослойки и 30–50% беременных имели циркулирующие антитела к токсину *Bordetella pertussis* [21]. В исследовании американских авторов удельный вес серопозитивных беременных был также гораздо ниже, и в возрасте 2 месяцев антитела у их детей уже отсутствовали [21]. В РФ вакцинация на первом году и ревакцинация в 18 месяцев при отсутствии бустерной вакцинации подростков и взрослых мало влияют на циркуляцию возбудителя, способствуя формированию естественной защиты, что подтверждается в нашем исследовании наличием высоких титров антител, характерных для недавней инфекции, у 25,8% обследованных. Однако ни одна из женщин не указала на перенесенный коклюш в анамнезе, вероятно, потому, что инфекция протекала в атипичной форме в виде синдрома длительного кашля. Так, по данным И.В. Бабаченко, распространенность коклюшной инфекции среди длительно кашляющих школьников и подростков составляет более 33%, несмотря на наличие в анамнезе прививок против коклюша у 72% обследованных пациентов [1].

Согласно опубликованным данным, в странах с высоким уровнем охвата вакцинацией детей заболеваемость сместилась в сторону подростков и взрослых [8]. Механизм этой эволюции не совсем понятен, вероятно, он многофакторный, обусловленный постепенным ослаблением естественного и вакцинального иммунитета и улучшением диагностики [12, 13, 21].

Среди женщин, предоставивших документированное подтверждение вакцинации против коклюша в детстве, серопозитивными оказались только 43,4%, то есть иммунитет после вакцинации не был продолжительным, что подтверждено результатами многочисленных

исследований, показавших, что после вакцинации цельноклеточными вакцинами, которыми и были привиты обследованные женщины в детстве, иммунитет сохраняется от 5 до 14 лет [13].

В группе беременных старше 30 лет и среди женщин с пятью и более беременностями в анамнезе доля серонегативных к коклюшу была выше, что не противоречит результатам исследования, проведенного в Аргентине, авторы которого указывают, что беременные в возрасте 25–39 лет имели более низкие титры антител [9].

Установлено, что между уровнем антител к коклюшу и сроком гестации существует отрицательная корреляция [15]. Результаты регрессионного анализа подтвердили, что фактором, влияющим на уровень антител к коклюшу в крови беременной женщины, является срок беременности. Постепенное снижение концентрации IgG к третьему триместру беременности также отмечается другими авторами и обусловлено как активным транспортом антител плоду, так и физиологическим увеличением объема циркулирующей крови у матери и совпадает с аналогичным изменением уровня альбумина [7, 14, 15, 20]. В исследованиях А. Malek и соавт. показано, что уровень общих IgG у женщины к 37–41 неделе беременности постепенно снижался примерно до 65% от первоначального уровня, определяемого на 9–16 неделе беременности [15].

С увеличением срока гестации количество серопозитивных женщин уменьшалось, и на 38–41 неделе удельный вес серопозитивных составил 21,7%. Следовательно, большинство новорожденных (78,3%) останутся незащищенными от коклюша. Учитывая, что период полураспада антител составляет около 5–6 недель (36,3–40,3 дня), можно предположить, что на протяжении первых трех месяцев жизни защищено материнскими антителами будет еще более меньшее количество младенцев [14].

По данным многочисленных зарубежных исследований и согласно мнению экспертов ВОЗ, для защиты от коклюша наиболее уязвимой категории детей от рождения до 3 месяцев необходимо введение возрастных ревакцинаций детей дошкольного возраста и подростков, кокон-иммунизация и вакцинация беременных женщин, а также вакцинация медицинских работников, особенно тех, которые имеют прямой контакт с беременными и детьми раннего возраста [3, 13, 22].

Список литературы/References

1. Бабаченко И.В., Нестерова Ю.В., Чернышова Ю.Ю., Карасев В.В., Починяева Л.М., Калисникова Е.Л. Клинико-эпидемиологические аспекты коклюша у детей в условиях массовой вакцинопрофилактики // Журнал инфектологии. 2019. Т. 11, № 2. С. 88–96. [Babachenko I.V., Nesterova Yu.V., Chernyshova Yu.Yu., Karasev V.V., Pochinyayeva L.M., Kalisnikova E.L. Clinical-epidemiological aspects of whooping cough in children in conditions of mass vaccinoprophylactics. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2019, vol. 11, no. 2, pp. 88–96. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2019-11-2-88-96

2. Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Зекорева А.Х. Проблема коклюша в некоторых регионах мира // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 354–362. [Basov A.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Zekoreeva A.Kh. The problem of pertussis in some regions of the world. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 354–362. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-354-362
3. Краснов В.В., Ильяненок К.Ф., Павлович Л.Р., Кузмичева М.В. Коклюш у детей первого года жизни // Детские инфекции. 2018. Т. 17, № 1. С. 12–17. [Krasnov V.V., Ilyanenkov K.F., Pavlovich L.R., Kuzmicheva M.V. Pertussis in infants. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2018, vol. 17, no. 1, pp. 12–17. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2018-17-1-12-17
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор, 2019. 254 с. [The sanitary-epidemiological conditions in the Russian Federation in 2018. State report. *Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor*, 2019. 254 p. (In Russ.)]
5. Таточенко В.К. Коклюш — недоуправляемая инфекция // Вопросы современной педиатрии. 2014. Т. 13, № 2. С. 78–82. [Tatochenko V.K. Pertussis — infection not under complete control. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 78–82. (In Russ.)] doi: 10.15690/vsp.v13i2.975
6. Харит С.М., Воронина О.Л., Лакоткина Е.А., Черныяева Т.В. Специфическая профилактика коклюша: проблемы и перспективы // Вопросы современной педиатрии. 2007. Т. 6, № 2. С. 71–77. [Kharit S.M., Voronina O.L., Lakotkina E.A., Chernyaeva T.V. Specific pertussis prevention: problems and perspectives. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*, 2007, vol. 6, no. 2, pp. 71–77. (In Russ.)]
7. Abu Raya B., Srugo I., Kesse A. The decline of pertussis-specific antibodies after tetanus, diphtheria, and acellular pertussis immunization in late pregnancy. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, pp. 1869–1873. doi: 10.1093/infdis/jiv324
8. Barkoff A.M., Gröndahl-Yli-Hannuksela K., He Q. Seroprevalence studies of pertussis: what have we learned from different immunized populations. *Pathogens and Disease*, vol. 73, no. 7, pp. 1–11. doi: 10.1093/femspd/ftv050
9. Fallo A., Manonelles G., Hozbor D., Lara C., Huespe M., Mazzeo S., Canle O., Galas M., López E. Pertussis seroprevalence in adults, post-partum women and umbilical cord blood. *Arch. Argent. Pediatr.*, 2014, vol. 112, no. 4, pp. 315–322. doi: 10.5546/aap.2014.315
10. Hashemi S.H., Zamani M., Mamani M., Javedanpoor R., Rahighi A.H., Nadi E. Seroprevalence of Bordetella pertussis antibody in pregnant women in Iran. *J. Res. Health. Sci.*, 2014, vol. 14, no. 2, pp. 128–131.
11. Healy C.M., Munoz F.M., Rench M.A., Halasa N.B., Edwards K.M., Baker C.J. Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord and infant serum. *J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 190, pp. 335–340. doi: 10.1086/421033
12. Huygen K., Rodeghiero C., Govaerts D., Leroux-Roels I., Melin P., Reynders M., Van Der Meeren S., Van Den Wijngaert S., Pierard D. Bordetella pertussis seroprevalence in Belgian adults aged 20–39 years, 2012. *Epidemiol. Infect.*, 2014, vol. 142, pp. 724–728. doi: 10.1017/S0950268813002458
13. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2016, vol. 29, no. 3, pp. 449–486. doi: 10.1128/CMR.00083-15
14. Malek A., Sager R., Kuhn P. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1996, vol. 36, pp. 248–255. doi: 10.1111/j.1600-0897.1996.tb00172.x
15. Marchi S., Viviani S., Montomoli E., Trombetta C.M. Low prevalence of antibodies against pertussis in pregnant women in Italy. *Lancet. Infect. Dis.*, 2019, vol. 19, no. 7: P690. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30269-5
16. Meng Q., Liu Y., Yu J., Li L., Shi W., Shen Y., Li L., Zhan S., Yang F., Wang Y., Yao K. Seroprevalence of maternal and cord antibodies specific for diphtheria, tetanus, pertussis, measles, mumps and rubella in Shunyi, Beijing. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 13021. doi: 10.1186/s12887-019-1860-5
17. Mooi F.R., de Greeff S.C. The case for maternal vaccination against pertussis *Lancet Infect. Dis.*, 2007, vol. 7, pp. 614–624. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70113-5
18. Naidu M.A., Muljadi R., Davies-Tuck M.L., Wallace E.M., Giles M.L. The optimal gestation for pertussis vaccination during pregnancy: a prospective cohort study. *Obstet. Gynecol.*, 2016, vol. 215, no. 2, pp. 237.e1–237.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2016.03.002
19. Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L. IgG Placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, 2012: 985646. doi: 10.1155/2012/985646
20. Van Rie A., Wendelboe A.M., Englund J.A. Role of maternal pertussis antibodies in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2005, vol. 24, no. 5, pp. 62–65. doi: 10.1097/01.inf.0000160915.93979.8f
21. WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper — August 2015. *Geneva: WHO; 2015. URL: https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pertussis/en*
22. Wiley K.E. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine*, 2013, vol. 31, pp. 618–625. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.052

Авторы:

Кригер Е.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;
Самодова О.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия;
Титова Л.В., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней Северного государственного медицинского университета, г. Архангельск, Россия.

Authors:

Krieger E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;
Samodova O.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;
Titova L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.03.2020
 Принята к печати 04.07.2020

Received 10.03.2020
 Accepted 04.07.2020

ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРИППА И ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У НАСЕЛЕНИЯ КАЗАХСТАНА В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2018–2019 гг.

Н.Г. Кливлеева¹, Н.С. Онгарбаева¹, А.М. Баймухаметова¹, Н.Т. Сактаганов¹,
Г.В. Лукманова¹, Т.И. Глебова¹, М.Х. Саятов¹, В.Э. Березин¹, Г.Е. Нусупбаева²,
А.М. Айкимбаев²

¹ ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан

² Филиал «Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» МЗ Республики Казахстан, г. Алматы, Казахстан

Резюме. Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции являются наиболее распространенными инфекционными заболеваниями современности, наносящими значительный вред здоровью человека и большой экономической ущерб. К возбудителям ОРВИ в настоящее время относят не менее пяти групп вирусов, включающих более 300 их подтипов. Для этих инфекционных агентов характерна высокая степень изменчивости, приводящая к смене антигенных характеристик вирусов, повышению их контагиозности, «ускользанию» от иммунного ответа, резистентности к химиопрепаратам. Актуальность проблемы гриппа и других ОРВИ обусловлена также быстрым формированием на их фоне бактериально-ассоциированных респираторных заболеваний. Угрозу представляют постоянная изменчивость вирусов гриппа и появление новых возбудителей ОРВИ. В последние годы наблюдается одновременная циркуляция вирусов гриппа подтипов А(Н1N1) и А(Н3N2), с доминированием пандемического штамма, и вирусов гриппа типа В. Среди возбудителей негриппозных ОРВИ чаще всего регистрируют респираторно-синцитиальный вирус, рино- и аденовирусы и вирусы парагриппа I/III. В статье представлены результаты вирусологических и серологических исследований клинических образцов, собранных в эпидемический сезон 2018–2019 гг. на территории Республики Казахстан. Для изучения циркуляции вирусов в эпидемический сезон 2018–2019 гг. у больных с диагнозами ОРВИ, ОРЗ, бронхит и пневмония был проведен сбор 2794 клинических образцов (2530 носоглоточных смывов и 264 сыворотки крови). Исследование носоглоточных смывов на грипп методом РТ-ПЦР показало, что в Казахстане циркулируют вирусы гриппа смешанной этиологии с преобладанием вируса А/Н1N1pdm. Так, генетический материал вируса гриппа обнаружен в 511 смывах (20,20% от общего числа обследованных проб). РНК вируса гриппа А выявлена в 508 биопробах: в 289 — А/Н1N1, в 209 — А/Н3N2, в 10 образцах установить субтип вируса не удалось. Вирус гриппа типа В обнаружен в трех образцах. Исследование 264 сывороток крови в РТГА и ИФА показало наличие у населения разных регионов Казахстана антител к вирусам гриппа А/Н1N1, А/Н3N2 и В, что косвенно подтверждает социркуляцию этих вирусов. На куриных эмбрионах выделено 42 изолята вируса гриппа, из которых 28 отнесены к вирусу гриппа А/Н1N1pdm, 13 — к А/Н3N2, один изолят идентифицирован как вирус гриппа В. При лабораторной диагностике клинических образцов на ОРВИ установлено, что среди выявленных негриппозных агентов пре-

Адрес для переписки:

Кливлеева Наиля Галивеевна
050010, Казахстан, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105, ТОО
Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии.
Тел.: 8 (727) 291-84-97 (внутренний 117, 134).
Факс: 8 (727) 291-84-96.
E-mail: biochem_vir@mail.ru, i_nailya@list.ru

Contacts:

Nailya G. Klivleyeva
050010, Kazakhstan, Almaty, Bogenbay batyr str., 105,
Research and production center for microbiology and virology.
Phone: +7 (727) 291-84-97 (internal 117, 134).
Fax: +7 (727) 291-84-96.
E-mail: biochem_vir@mail.ru, i_nailya@list.ru

Для цитирования:

Кливлеева Н.Г., Онгарбаева Н.С., Баймухаметова А.М., Сактаганов Н.Т.,
Лукманова Г.В., Глебова Т.И., Саятов М.Х., Березин В.Э., Нусупбаева Г.Е.,
Айкимбаев А.М. Обнаружение возбудителей гриппа и острых
респираторных вирусных инфекций у населения Казахстана
в эпидемический сезон 2018–2019 гг. // Инфекция и иммунитет. 2021.
Т. 11, № 1. С. 137–147. doi: 10.15789/2220-7619-DOI-1348

Citation:

Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Baimukhametova A.M., Saktaganov N.T.,
Lukmanova G.V., Glebova T.I., Sayatov M.Kh., Berezin V.E., Nusupbaeva G.E.,
Aikimbayev A.M. Detection of influenza virus and pathogens of acute respiratory
viral infections in population of Kazakhstan during 2018–2019 epidemic
season // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2021, vol. 11, no. 1, pp. 137–147. doi: 10.15789/2220-7619-DOI-1348

обладал респираторно-синцитиальный вирус, реже встречались риновирусы и аденовирусы. Метапневмовирусы, бокавирусы, коронавирусы и вирусы парагриппа I типа были обнаружены в единичных случаях. Сравнение результатов исследований с результатами изучения циркуляции возбудителей гриппа в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. показало, что в Казахстане в 2018–2019 гг., как и в предыдущем эпидсезоне, продолжалась социркуляция вирусов гриппа А и В с доминированием вируса А/Н1N1pdm. Выявление негриппозных вирусов — возбудителей респираторных инфекций в 2018–2019 гг. — показало преобладание респираторно-синцитиального вируса, что коррелирует с результатами эпидсезона 2017–2018 гг.

Ключевые слова: ПЦР-диагностика, вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, вирус гриппа А(Н3N2), вирус гриппа В, ОРВИ, популяционный иммунитет.

DETECTION OF INFLUENZA VIRUS AND PATHOGENS OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS IN POPULATION OF KAZAKHSTAN DURING 2018–2019 EPIDEMIC SEASON

Klivleyeva N.G.^a, Ongarbayeva N.S.^a, Baimukhametova A.M.^a, Saktaganov N.T.^a, Lukmanova G.V.^a, Glebova T.I.^a, Sayatov M.Kh.^a, Berezin V.E.^a, Nusupbaeva G.E.^b, Aikimbayev A.M.^b

^a Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

^b Scientific and Practical Center for Sanitary and Epidemiological Examination and Monitoring, Branch of the RSE on REM National Center for Public Health of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan

Abstract. Influenza and other acute respiratory viral infections are the most common infectious diseases of our time, causing a significant harm to human health as well as great economic damage. At least five groups of viruses, including more than 300 subtypes, are currently related to ARVI pathogens. Such infectious agents are characterized by a high degree of variability resulting in replaced virus antigenic characteristics augmenting their contagiousness, immunoevasion, and resistance to chemotherapeutic drugs. Of relevance, influenza and other ARVIs also pose a threat due to subsequent rapid formation of bacterially-associated respiratory diseases as well as their continuous variability and emergence of new pathogenic species. In recent years, subtype A (H1N1) and A (H3N2) with predominance of pandemic strain, as well as type B influenza viruses have been simultaneously found in circulation. Most common among the causative agents of non-influenza ARVIs, are respiratory syncytial virus, rhino- and adenoviruses, as well as I/III parainfluenza viruses. Here we present the results of virological and serological studies of clinical samples collected during the 2018–2019 epidemic season in the territory of the Republic of Kazakhstan after analyzing 2794 clinical samples (2530 nasopharyngeal swabs and 264 blood serum samples) of patients diagnosed with ARVI, ARI, bronchitis, and pneumonia. Examining nasopharyngeal swabs by using RT-PCR showed that the mixed etiology influenza viruses with predominant A/H1N1pdm virus circulated in Kazakhstan. In particular, influenza virus genetic material was found in 511 swabs (20.20% of total examined samples), so that influenza A virus RNA was detected in 508 biological samples such as A/H1N1 — in 289, A/H3N2 — 209, unverified virus subtype — 10 samples. Type B influenza virus was detected in 3 samples. Analyzing 264 blood serum samples by the HAI assay and ELISA showed the presence of antibodies specific to influenza A/H1N1, A/H3N2, and B viruses in the population of various regions of Kazakhstan, thereby indirectly confirming their co-circulation. 42 influenza virus strains were isolated in chicken embryos, of which 28 were assigned to A/H1N1pdm virus, 13 — A/H3N2 virus, and one isolate was identified as influenza B virus. The laboratory diagnostics of clinical samples for ARVIs revealed that respiratory syncytial virus prevailed among identified non-influenza agents, whereas rhino- and adenoviruses were less common. Metapneumoviruses, bocaviruses, coronaviruses, and type I parainfluenza viruses were detected in few cases. Comparison of our study data with the data on 2017–2018 circulation of influenza pathogens showed that in Kazakhstan influenza A and B viruses continued to circulate, with the dominance of A/H1N1pdm virus as it was in the previous epidemic season. Identification of non-influenza viruses, the causative agents of 2018–2019 respiratory infections, showed the predominance of respiratory syncytial virus that correlated with the aforementioned results.

Key words: PCR diagnostics, influenza A(H1N1)pdm09 virus, influenza A(H3N2) virus, influenza B virus, ARVI, population immunity.

Введение

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются наиболее распространенными инфекционными заболеваниями современности, наносящими не только значительный вред здоровью человека, но и чрезвычайно большой экономической ущерб. Очень велико социальное значение этих инфекций. Даже обычный сезонный вирус гриппа и связанные с ним осложнения служат причиной смерти более 200 тыс.

человек в год. В случае же возникновения высокопатогенных пандемических штаммов гриппа число погибших может исчисляться миллионами и десятками миллионов. Так, печально известный «испанский» грипп А(Н1N1), свирепствовавший в начале XX века, унес жизни более 50 млн человек, «гонконгский» грипп А(Н3N2), пандемия которого наблюдалась в конце 70-х годов, явилась причиной гибели более 5 млн человек [15, 16]. В настоящее время наибольшую угрозу представляют новые пандемические варианты вируса

гриппа А, которые могут возникнуть в результате рекомбинации генов вирусов гриппа человека, млекопитающих и птиц, а также возврат старых высокопатогенных штаммов, к которым у населения уже отсутствует иммунитет [19].

Спектр эпидемических штаммов вируса гриппа и их характеристика меняются в зависимости от сезона. В последнее время в мире, в том числе и в различных регионах Казахстана, наблюдается одновременная циркуляция вирусов гриппа подтипов А(Н1N1), А(Н3N2) и В [6, 7]. Кроме того, необычайная сложность эпидемической ситуации связана с появлением реассортантных вирусов. Поэтому грипп, несмотря на успехи, достигнутые в области лечения и профилактики, является одной из немногих инфекций, вызывающих непредсказуемые и чрезвычайные эпидемические ситуации [14].

ОРВИ — это вызываемые различными вирусами болезни верхних дыхательных путей, которые являются наиболее распространенными инфекциями и составляют около 50% общего числа острых заболеваний человека [1, 2]. На каждого взрослого в среднем приходится 3–4 случая заболевания в год. Доля ОРВИ составляет 30–40% среди болезней, приводящих к временной нетрудоспособности населения, и 60–80% — среди болезней, приводящих к потерям учебного времени среди школьников [4, 9].

К числу возбудителей ОРВИ в настоящее время относят не менее пяти групп вирусов, включающих более 300 их подтипов (респираторно-синцициальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа, гриппа, аденовирусы, риновирусы, реовирусы и др.). Для этих инфекционных агентов характерна высокая степень изменчивости, приводящая к смене антигенных характеристик вирусов, повышению их контагиозности, «ускользанию» от иммунного ответа (грипп), резистентности к химиопрепаратам и, соответственно, снижению эффективности их профилактики и лечения [13].

Актуальность проблемы ОРВИ обусловлена не только высокой распространенностью, возникновением временной нетрудоспособности, снижением качества жизни, увеличением потребления лекарств, но и значительной вероятностью осложненного течения и обострения хронических неинфекционных заболеваний ОРВИ, а также быстрым формированием на этом фоне бактериально-ассоциированных респираторных заболеваний [8, 10].

Различная этиология ОРВИ со сходной симптоматикой обуславливает необходимость идентификации возбудителей в ранние сроки болезни с целью предотвращения перекрестного инфицирования в случае госпитализации, выбора правильной тактики лечения и своевременного выявления осложнений, присущих каждой инфекции, а также для решения эпидемиологических задач.

Высокая мобильность населения и увеличение процента урбанизации приводит к тому, что едва ли не каждый человек ежегодно переносит ОРВИ. В наибольшей степени сезонной заболеваемости подвержены дети, пожилые люди и лица с сопутствующими заболеваниями. Особенно опасны осложнения, связанные с ОРВИ, их тяжесть также варьируется в различных группах населения и может быть связана с обострением хронических заболеваний, в том числе астмы, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней почек и т. д. [18, 19].

Что касается экономического ущерба от заболеваемости гриппом и ОРВИ, то в мире он ежегодно исчисляется десятками миллиардов долларов. Только потери от временной нетрудоспособности людей и страховые выплаты при ежегодных вспышках гриппа и ОРВИ оцениваются специалистами в 80–100 млрд долларов [17].

Несмотря на то, что грипп и ОРВИ человека составляют группу заболеваний с похожими клиническими проявлениями, вызывающие их вирусные агенты значительно отличаются по патогенности, летальности для человека и стратегии лечения. Дифференциальная диагностика возбудителей гриппа и ОРВИ человека позволяет скорректировать схему лечения и более эффективно использовать ресурсы системы здравоохранения, а в межэпидемический период правильно определить тактику вакцинации и подобрать подходящий вариант вакцины.

Целью настоящего исследования явилось выявление возбудителей гриппа и ОРВИ, циркулирующих среди населения РК в эпидемический сезон 2018–2019 гг.

Материалы и методы

Сбор клинических образцов (носоглоточные смывы, сыворотки крови) у больных осуществляли в 2018–2019 гг. в поликлиниках и инфекционных больницах пяти регионов Казахстана (Северный регион — Акмолинская, Северо-Казахстанская, Костанайская, Павлодарская области и г. Нур-Султан; Южный регион — Алматинская, Кызылординская и Туркестанская области; Западный регион — Атырауская, Актюбинская, Западно-Казахстанская и Мангыстауская области; Восточный регион — Восточно-Казахстанская область, г. Усть-Каменогорск; Центральный регион — Карагандинская область).

Носоглоточные смывы собирали в стерильные пробирки с 2 мл среды 199 с 0,5%-ным бычьим сывороточным альбумином и комплексом антибиотиков (пенициллин — 50 000 ед/мл, стрептомицин — 50 мкг/мл, гентамицин — 3000 мкг/мл, нистатин — 5000 ед/мл). Пробы выдерживали в течение суток при 4°C и хранили в низкотемпературном морозильнике при –80°C.

Для выделения РНК из исследуемых образцов и проведения реакции обратной транскрипции с целью получения к-ДНК использовали наборы «Рибо-Преп» и «Реверта-Л». Первичный скрининг проводили в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией с наборами реагентов для выявления РНК вирусов гриппа и ОРВИ: «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) на приборе Rotor-Gene Qplex (Qiagen, Германия).

Серологические исследования сывороток крови проводили с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА) согласно рекомендациям ВОЗ [20]. Для РТГА использовали референсные и казахстанские штаммы вирусов гриппа А/Н1Н1, А/Н3Н2 и В, хранящиеся в коллекции лаборатории биохимии вирусов и диагностических наборов антигенов производства ООО «ППДП» (Санкт-Петербург, Россия). ИФА выполняли с использованием тест-систем к вирусам гриппа подтипов А(Н1Н1) и А(Н3Н2) и штаммов вирусов рода В того же производителя.

Изоляцию вируса осуществляли на 9–10-дневных куриных эмбрионах (КЭ) методом, рекомендованным ВОЗ [20]. Для индикации вируса в реакции гемагглютинации (РГА) использовали 0,75%-ную взвесь эритроцитов петуха и человека 0(I) группы крови [3].

При статистической обработке для всех серий результатов находили средние геометрические значения титров обратных логарифмов по основанию 2 и их стандартные отклонения с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 [5].

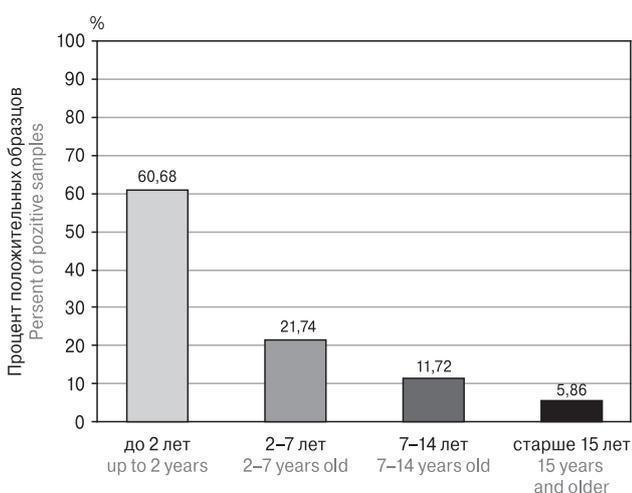


Рисунок 1. Возрастная структура обследованных больных в эпидемический сезон 2018–2019 гг. в % выражении

Figure 1. Age structure of the examined patients in the epidemic season 2018–2019, in % terms

Результаты

Для изучения циркуляции вирусов гриппа среди населения в эпидемический сезон 2018–2019 гг. у больных с диагнозами ОРВИ, ОРЗ, бронхит и пневмония совместно с медицинским персоналом в поликлиниках и инфекционных больницах различных регионов Казахстана проведен сбор биологических материалов (носоглоточные смывы и сыворотки крови). Всего собрано 2794 образцов (2530 смывов и 264 сыворотки крови). Количество исследованных биологических образцов по областям РК представлено в табл. 1.

Как видно из табл. 1, наибольшее количество образцов (носоглоточные смывы) получено у больных людей из Северного и Южного Казахстана — 953 пробы (37,66% от общего числа образцов) и 690 биопроб (27,27%) соответственно. В Западном, Восточном и Центральном Казахстане собрано 400 (15,81%), 337 (13,32%) и 150 (5,92%) носоглоточных смывов соответственно. Наибольшее количество сывороток крови получено из Западного (82 пробы — 31% от общего числа сывороток крови) и Южного (78 проб — 29,54%) Казахстана. Из Северного, Центрального и Восточного Казахстана для исследования поступило 58 (21,96%), 32 (12,12%) и 14 (5,3%) образцов сывороток крови соответственно.

На рис. 1 показана возрастная структура обследованных больных в процентном соотношении.

Как видно из рис. 1, количество образцов, собранных от взрослого населения, составило 5,45% (138 образцов) от общего числа проб. У детей взято 94,55% образцов (2392 смыва), среди них число обследованных до двух лет составило 60,12% (1521 проба), 2–7 лет — 21,90% (554 смывов), 7–14 лет — 12,53% (317 образцов).

На рис. 2 показано соотношение собранных образцов в зависимости от диагноза обследованных больных.

Процент положительных образцов в зависимости от диагноза составил: ОРВИ — 86,21% (2181 образец), ОРЗ — 8,10% (205 образца), бронхит — 2,89% (73 образца) и пневмония — 2,81% (71 образец).

Проведено молекулярно-генетическое исследование 2530 носоглоточных смывов на наличие вирусов гриппа и других ОРВИ. В табл. 2 представлены характеристика собранного материала и результаты первичного скрининга носоглоточных смывов в РТ-ПЦР на наличие возбудителей гриппа.

Как показано в табл. 2, генетический материал вируса гриппа обнаружен в 511 смывах (20,20% от общего числа обследованных проб). РНК вируса гриппа А выявлена в 508 биопробах (20,08%), вируса гриппа типа В — в 3 образцах (0,11%). Субтипирование ПЦР-положительных образцов на вирус гриппа типа А показало наличие генетического материала вируса гриппа

А/Н1N1 в 289 пробах (11,42%), РНК вируса гриппа А/Н3N2 в 209 смывах (8,26%). В 10 образцах (0,39%) установить субтип вируса не удалось. Таким образом, первичный скрининг носоглоточных смывов в РТ-ПЦР показал, что в исследованных областях Республики Казахстан циркулируют вирусы гриппа смешанной этиологии с преобладанием вируса А/Н1N1pdm.

Наибольшее количество ПЦР-положительных проб обнаружено у людей в Южном и в Северном регионе Казахстана — 166 проб (24,05%) из 690 образцов и 191 проба (20,04%) из 953 смывов соответственно. Незначительно уступали по количеству ПЦР-положительных проб Западный и Центральный регионы республики: их показатели составили 76 (19,00%) из 400 полученных клинических образцов и 26 (17,30%) из 150 проб соответственно. В Восточном Казахстане из 337 образцов выявлено 49 ПЦР-положительных проб (14,54%).

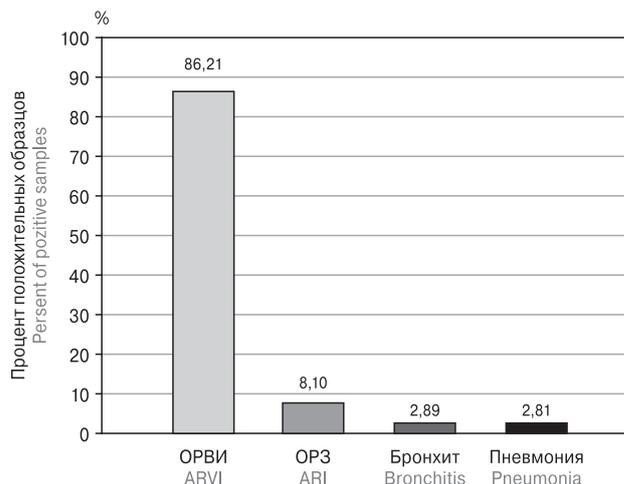


Рисунок 2. Первичный диагноз обследованных больных

Figure 2. The initial diagnosis of the examined patients

Таблица 1. Количество клинических образцов, собранных в Республике Казахстан в эпидемический сезон 2018–2019 гг.

Table 1. The number of clinical samples collected in the Republic of Kazakhstan during the epidemic season 2018–2019

Место сбора The region	Количество носоглоточных смывов The number of nasopharyngeal swabs	Количество сывороток крови The number of blood serum
Южный Казахстан/Southern Kazakhstan		
Алматинская область/Almaty Region	340	61
Кызылординская область/Kyzylorda Region	300	17
Туркестанская область/Turkistan Region	50	–
Итого/Total	690	78
Северный Казахстан/Northern Kazakhstan		
Акмолинская область/Akmola Region	170	15
Северо-Казахстанская область/North Kazakhstan Region	252	43
Костанайская область/Kostanay Region	190	–
Павлодарская область/Pavlodar Region	321	–
г. Нур-Султан/Nur-Sultan City	20	–
Итого/Total	953	58
Западный Казахстан/Western Kazakhstan		
Атырауская область/Atyrau Region	80	12
Актюбинская область/Aktobe Region	140	–
Западно-Казахстанская область/West Kazakhstan Region	140	70
Мангыстауская область/Mangystau Region	40	–
Итого/Total	400	82
Восточный Казахстан/Eastern Kazakhstan		
Восточно-Казахстанская область/East Kazakhstan Region	100	14
г. Усть-Каменогорск/Ust-Kamenogorsk City	237	–
Итого/Total	337	14
Центральный Казахстан/Central Kazakhstan		
Карагандинская область/Karaganda Region	150	32
Итого/Total	150	32
Всего/Altogether	2530	264

Примечание. «–» — сбор не проводили.

Note. “–” — no collection.

Таблица 2. Скрининг в РТ-ПЦР клинических образцов, собранных в 2018–2019 гг. в Республике Казахстан, на наличие возбудителей гриппа
 Table 2. Screening in RT-PCR of clinical samples collected in 2018–2019 in the Republic of Kazakhstan for the presence of influenza pathogens

Регион The region	Количество носоглоточных смывов The number of nasopharyngeal swabs	Количество ПЦР-положительных проб The number of PCR positive samples				
		к вирусу гриппа рода А to Influenza virus A genus	к вирусам подтипов: subtype viruses:		к вирусу гриппа А с неопределенным субтипом to undetermined Influenza A virus	к вирусу гриппа рода В to Influenza virus B genus
			А/Н1N1рdm	А/Н3N2		
Южный Казахстан/Southern Kazakhstan						
Алматинская область/Almaty Region	340	97	53	39	5	2
Кызылординская область/Kyzylorda Region	300	63	46	17	0	0
Туркестанская область/Turkistan Region	50	6	3	3	0	0
Итого/Total	690	166	102	59	5	2
Северный Казахстан/Northern Kazakhstan						
Акмолинская область/Akmola Region	170	38	4	34	0	0
Северо-Казахстанская область/North Kazakhstan Region	252	44	30	12	2	0
Костанайская область/Kostanay Region	190	49	31	18	0	0
Павлодарская область/Pavlodar Region	321	57	42	15	0	0
г. Нур-Султан/Nur-Sultan City	20	3	0	3	0	1
Итого/Total	953	191	107	82	2	1
Западный Казахстан/Western Kazakhstan						
Атырауская область/Atyrau Region	80	19	8	11	0	0
Актюбинская область/Aktobe Region	140	30	17	13	0	0
Западно-Казахстанская область/West Kazakhstan Region	140	18	9	9	0	0
Мангыстауская область/Mangystau Region	40	9	5	4	0	0
Итого/Total	400	76	39	37	0	0
Восточный Казахстан/Eastern Kazakhstan						
Восточно-Казахстанская область/East Kazakhstan Region	100	23	14	9	0	0
г. Усть-Каменогорск/Ust-Kamenogorsk City	237	26	10	13	3	0
Итого/Total	337	49	24	22	3	0
Центральный Казахстан/Central Kazakhstan						
Карагандинская область/Karaganda Region	150	26	17	9	0	0
Итого/Total	150	26	17	9	0	0
Всего/Altogether	2530	511	289	209	10	3

Таблица 3. Скрининг в РТ-ПЦР клинических образцов, собранных в 2018–2019 гг. в Республике Казахстан, на наличие возбудителей ОРВИ

Table 3. Screening in RT-PCR of clinical samples collected in 2018–2019 in the Republic of Kazakhstan for the presence of acute respiratory viral infections

Регион The region	Количество носоглоточных смазков The number of nasopharyngeal swabs	Количество положительных проб Number of positive samples	Количество ПЦР-положительных проб The number of PCR positive samples							
			к респираторно- синциальному вирусу человека to HRSV	к аденовирусу to hAdV	к риновирусу to hRV	к вирусу парагриппа to hPIV 2/4	к коронавирусу to hCoV	к вирусу парагриппа to hPIV 1/3	к метанемовирусу to hMPV	к бокавирусу to hBoV
Южный Казахстан/Southern Kazakhstan										
Алматинская область/Almaty Region	241	105	74	4	18	0	2	4	2	1
Кызылординская область/Kyzylorda Region	237	116	81	6	19	0	3	4	3	0
Туркестанская область/Turkistan Region	44	11	7	0	3	0	0	0	1	0
Итого/Total	522	232	162	10	40	0	5	8	6	1
Северный Казахстан/Northern Kazakhstan										
Акмолинская область/Akmola Region	132	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Северо-Казахстанская область/North Kazakhstan Region	208	23	6	1	2	0	4	2	8	0
Костанайская область/Kostanay Region	141	3	1	0	0	0	1	0	0	1
Павлодарская область/Pavlodar Region	264	1	1	0	0	0	0	0	0	0
г. Нур-Султан/Nur-Sultan City	16	8	6	0	2	0	0	0	0	0
Итого/Total	761	36	14	1	5	0	5	2	8	1
Западный Казахстан/Western Kazakhstan										
Атырауская область/Atyrau Region	61	30	21	1	5	0	1	1	1	0
Актыбинская область/Aktobe Region	110	54	39	3	6	0	1	2	3	0
Западно-Казахстанская область/West Kazakhstan Region	122	2	1	0	0	0	1	0	0	0
Мангыстауская область/Mangystau Region	31	15	11	0	3	0	0	1	0	0
Итого/Total	324	101	72	4	14	0	3	4	4	0
Восточный Казахстан/Eastern Kazakhstan										
Восточно-Казахстанская область/East Kazakhstan Region	77	38	26	2	6	0	1	1	2	0
г. Усть-Каменогорск/Ust-Kamenogorsk City	211	14	1	0	10	0	1	1	1	0
Итого/Total	288	52	27	2	16	0	2	2	3	0
Центральный Казахстан/Central Kazakhstan										
Карагандинская область/Karaganda Region	124	40	15	10	9	0	3	3	0	0
Итого/Total	124	40	15	10	9	0	3	3	0	0
Всего/Altogether	2019	461	290	27	84	0	18	19	21	2

Таблица 4. Результаты идентификации изолятов вируса гриппа, циркулировавших на территории Республики Казахстан в 2018–2019 гг.

Table 4. The results of the identification of influenza virus isolates circulating in Kazakhstan in 2018–2019

Регион The region	Принадлежность изолята Isolate accessory		Итого Total	
	к вирусу гриппа А to influenza A virus			к вирусу гриппа В to influenza B virus
	А/Н1N1 pdm	А/Н3N2		
Алматинская область/Almaty Region	3	2	1	6
Павлодарская область/Pavlodar Region	8	–	–	8
Северо-Казахстанская область/North Kazakhstan Region	7	–	–	7
Карагандинская область/Karaganda Region	5	–	–	5
Восточно-Казахстанская область/East Kazakhstan Region	2	11	–	13
Западно-Казахстанская область/West Kazakhstan Region	3	–	–	3
Итого/Total	28	13	1	42

Примечание. «–» — изоляты с подобной антигенной формулой не выявлены.

Note. «–» — isolates with a similar antigenic formula were not detected.

Результаты молекулярно-генетического исследования клинических образцов на наличие возбудителей ОРВИ представлены в табл. 3. Исследовано 2019 из 2530 клинических образцов, не давших положительного результата на вирус гриппа.

Как видно из табл. 3, генетический материал возбудителей ОРВИ обнаружен в 461 образце (22,83% от общего числа исследованных проб). Аденовирус выявлен в 27 пробах (1,33%), риновирус — в 84 (4,16%), коронавирус — в 18 (0,89%), вирус парагриппа I/III типов — в 19 (0,94%), метапневмовирус — в 21 (1,04%), бокавирус — в 2 образцах (0,09%). Наибольшее количество положительных образцов выявлено к РСВ (290 проб — 14,36%).

Таким образом, при первичном скрининге носоглоточных смывов в РТ-ПЦР установлена циркуляция в исследованных областях РК вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2, В и возбудителей ОРВИ.

Для изучения сероэпидемиологической ситуации по гриппу в 2018–2019 гг. в РТГА и ИФА исследовано 264 сыворотки крови, собранные в различных регионах Казахстана. Результаты РТГА представлены на рис. 3.

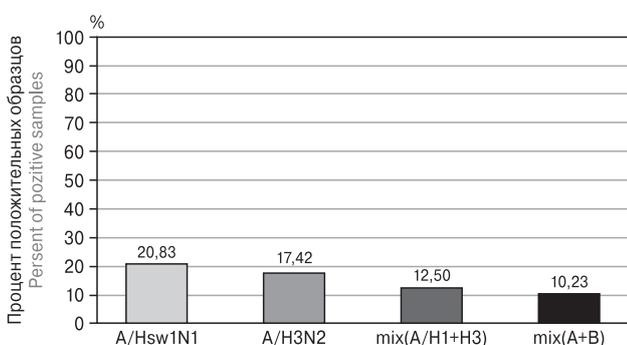
**Рисунок 3. Выявление антител к вирусам гриппа в сыворотках крови людей в РТГА**

Figure 3. Detection of antibodies to influenza viruses in human serum in HI assay

В РТГА антитела к вирусам гриппа в титрах 1:80–1:320 выявлены в 60,98% от общего количества исследованных проб (161 образец). Сыворотки, реагирующие с антигенами в титрах менее 1:80, учитывались как отрицательный результат. Как видно на рис. 4, антигемагглютинины к вирусу подтипа А/Нsw1N1 обнаружены в 20,83% случаев от общего числа образцов (55 проб), из них 15,53% (41 образец) реагировали также с вирусом А/California/04/09 pdm. Антитела к вирусу А/Wisconsin/67/05 (Н3N2) обнаружены в 17,42% (46 сывороток). Наличие антител одновременно к двум подтипам вирусов гриппа А (А/Н1N1 и А/Н3N2) выявлено в 12,50% случаев (33 сыворотки), к вирусам гриппа А и В — в 10,23% (27 проб).

Результаты исследования 264 сывороток крови в ИФА представлены на рис. 4.

Исследование сывороток методом ИФА выявило антитела к вирусам гриппа в 161 образце, что составляет 60,98% от общего количества исследованных проб. Как показано на рис. 4, образцы, содержащие антигемагглютинины к вирусам гриппа А/Нsw1N1, обнаружены в 19,32% случаев (51 биопроба), к А/Н3N2 — в 18,18% (48 образцов), к вирусу гриппа В — в 12,50% (33 пробы). Антитела одновременно к двум родам вирусов гриппа (А и В) выявлены в 10,98% сывороток крови (29 образцов).

Таким образом, исследование сывороток крови в РТГА и ИФА показало наличие у населения Казахстана антител к вирусам гриппа А/Нsw1N1, А/Н3N2 и В, что указывает на социркуляцию этих вирусов.

При первичном заражении 9–10-дневных КЭ ПЦР-положительными пробами, собранными у людей в различных регионах Казахстана, выделено 42 изолята вируса гриппа: шесть — от больных из Алматинской области, восемь — из Павлодарской, семь — из Северо-Казахстанской, пять — из Карагандинской, 13 — из Восточно-Казахстанской и три — из Западно-Казахстанской областей.

В табл. 4 представлены результаты проведенной в РТГА, РИНА и ПЦР идентификации изолятов вирусов гриппа, циркулировавших на территории Казахстана в 2018–2019 гг.

Из табл. 4 видно, что наибольшее количество изолятов идентифицированы как вирусы гриппа А (41 изолят (97,61%) из 42 выделенных). К вирусу гриппа А/Н1N1pdm отнесены 28 изолятов, к А/Н3N2 — 13. Лишь один изолят, выделенный в Алматинской области (Южный Казахстан), идентифицирован как вирус гриппа В.

Таким образом, результаты вирусологических и серологических исследований, как и данные молекулярно-генетического анализа в РТ-ПЦР биопроб, полученных от больных людей, указывают на социркуляцию в эпидсезоне 2018–2019 гг. вирусов гриппа А и В и доминирование вируса А/Н1N1pdm.

Обсуждение

Заболеемость ОРВИ и гриппом продолжает оставаться на высоком уровне, ежегодно возрастающая в осенне-зимний период. Результаты исследований показывают, что в последние эпидсезоны наблюдается одновременная циркуляция вирусов гриппа подтипов А(Н1N1) и А(Н3N2), с доминированием пандемического штамма, а также вирусов гриппа типа В. Среди возбудителей ОРВИ чаще всего продолжают регистрироваться РСВ, рино- и аденовирусы и парагрипп I/III. Угрозу представляют постоянная изменчивость вирусов гриппа и появление новых возбудителей ОРВИ, на долю которых приходится 80–90% всех случаев инфекционной патологии.

В 2018–2019 гг. в поликлиниках и лечебных учреждениях пяти регионов Казахстана, включающих 13 областей и города Нур-Султан и Усть-Каменогорск, у больных людей с диагнозами ОРВИ, ОРЗ, бронхит и пневмония получено 2794 биопробы (2530 носоглоточных смыва и 264 сыворотки крови).

При молекулярно-генетическом исследовании в РТ-ПЦР 2530 клинических образцов генетический материал вируса гриппа А был обнаружен в 20,08% проб, вируса гриппа В — в 0,11%. При субтипировании РНК вируса гриппа А подтип А/Н1 идентифицирован в 11,42%, А/Н3 — в 8,26%. В 0,39% проб установить подтип вируса не удалось.

Изучение циркуляции вирусов гриппа в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. показало, что в Казахстане наблюдалась параллельная циркуляция вирусов гриппа А/Н1N1pdm, А/Н3N2 и В, с первой недели активизировался вирус гриппа А/Н1N1pdm, который к концу эпидсезона доминировал над другими вирусами гриппа [11, 12].

Результаты, полученные в эпидсезоне 2018–2019 гг., указывают на продолжение социркуляции вирусов гриппа А и В и доминирование вируса А/Н1N1pdm.

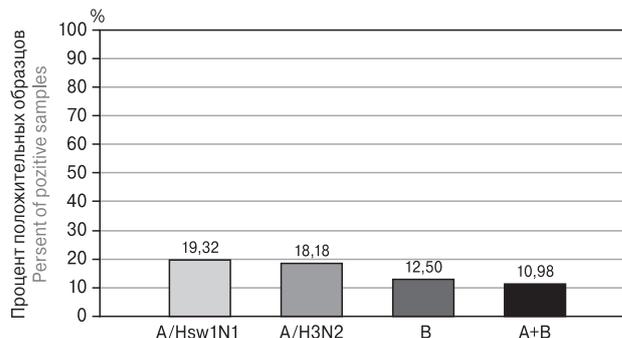


Рисунок 4. Выявление антител к вирусам гриппа в сыворотках крови людей в ИФА

Figure 4. Detection of antibodies to influenza viruses in human serum in ELISA

При лабораторной диагностике на ОРВИ клинических образцов, полученных у больных людей в эпидсезоне 2017–2018 гг., установлено, что среди выявленных негриппозных вирусов преобладали РСВ, риновирусы, аденовирусы и вирусы парагриппа I типа. Метапневмовирусы, бокавирусы и коронавирусы были обнаружены в единичных случаях [3].

При изучении методом РТ-ПЦР 2019 носоглоточных смывов, полученных в эпидсезоне 2018–2019 гг., генетический материал возбудителей ОРВИ был обнаружен в 22,83% случаев: аденовирус выявлен в 1,33% проб, риновирус — в 4,16%, коронавирус — в 0,89%, вирус парагриппа I/III типов — в 0,94%, метапневмовирус — в 1,04%, бокавирус — в 0,09%. Наибольшее количество положительных образцов выявлено к РСВ — 14,36%.

Результаты первичного скрининга методом РТ-ПЦР клинических образцов, собранных в различных регионах Казахстана в эпидемический сезон 2018–2019 гг., на наличие возбудителей ОРВИ коррелируют с результатами эпидсезона 2017–2018 гг. Наблюдалось продолжение циркуляции этих же типов ОРВИ с преимущественным преобладанием респираторно-синцитиальной инфекции, доля которой составила 14,36% (290 образцов).

Исследование сывороток крови в РТГА и ИФА показало наличие у населения разных регионов Казахстана антител к вирусам гриппа А/Нsw1N1, А/Н3N2 и В, что косвенно подтверждает социркуляцию этих вирусов.

При вирусологическом исследовании носоглоточных смывов на КЭ выделено 42 изолята, из которых 28 отнесены к вирусу гриппа А/Н1N1pdm, 13 — к А/Н3N2. Лишь один изолят, выделенный в Алматинской области (Южный Казахстан), идентифицирован как вирус гриппа В.

Результаты вирусологических и серологических исследований, как и данные молекулярно-генетического анализа в РТ-ПЦР биопроб, собранных у больных людей, указывают на социркуляцию в эпидсезоне 2018–2019 гг. вирусов гриппа А и В и доминирование вируса А/Н1N1pdm.

В настоящее время, к сожалению, существует значительный разрыв между возможностями диагностики респираторных вирусных инфекций, предоставляемыми современными методами вирусологии и молекулярной биологии, и уровнем реализации этих возможностей в клинических лабораториях. Открытым остается вопрос этиотропной терапии ОРВИ, поскольку арсенал лекарственных средств, эффективных в отношении респираторных вирусов, на сегодняшний день ограничен.

Несмотря на то, что ОРВИ человека составляют группу заболеваний с похожими клини-

ческими проявлениями, вызывающие их вирусные агенты значительно отличаются по патогенности, летальности для человека и стратегии лечения. Дифференциальная диагностика возбудителей ОРВИ человека позволяет скорректировать схему лечения и более эффективно использовать ресурсы системы здравоохранения.

Работа выполнена в рамках Научно-технической программы Комитета науки Министерства науки и образования Республики Казахстан «Разработка оригинальных отечественных препаратов с противовирусной активностью, эффективных в отношении COVID-19 и гриппа».

Список литературы/References

1. Бартлетт Д. Инфекции дыхательных путей. СПб., 2000. 192 с. [Bartlett J.V. Management of respiratory tract infections. *St. Petersburg, 2000. 192 p. (In Russ.)*]
2. Беляев А.Л., Бурцева Е.И., Феодоритова Е.Л., Слепушкин А.Н. Профилактика гриппа — важнейшее мероприятие отечественного здравоохранения. М.: РЭТ-инфо, 2007. № 4 (64). С. 44–45. [Belyaev A.L., Burtseva E.I., Feodoritova E.L., Slepushkin A.N. Influenza prophylaxis is a major national health care event. *Moscow: RET-info, 2004, no. 4, pp. 29–33. (In Russ.)*]
3. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: методические рекомендации; утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва, 2006. 22 с. [Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification: methodical recommendations; approved by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. *Moscow, 2006. 22 p. (In Russ.)*]
4. Вялов С.С., Кузнецов В.И. Острые респираторные вирусные инфекции: как лечить и предупреждать эффективно // Поликлиника. 2009. № 5. С. 28–31. [Vyalov S.S., Kuznetsov V.I. Acute respiratory viral infections: how to treat and prevent effectively. *Poliklinika = Polyclinic, 2009, no. 5, pp. 28–31. (In Russ.)*]
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с. [Glants S. Biomedical statistics. *Moscow: Practice, 1999. 459 p. (In Russ.)*]
6. Кливлеева Н.Г., Онгарбаева Н.С., Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Шаменова М.Г., Саятов М.Х., Березин В.Э., Нусупбаева Г.Е., Айкимбаев А.М., Вебби Р. Дж. Циркуляция вирусов гриппа среди людей и свиней на территории Казахстана в 2017–2018 гг. // Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан. 2019. Т. 2, № 378. С. 6–13. [Klivelyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Saktaganov N.T., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Shamenova M.G., Sayatov M.Kh., Berezin V.E., Nusupbaeva G.E., Aikimbayev A.M., Webby R.J. Circulation of influenza viruses among humans and swine in the territory of Kazakhstan during 2017–2018. *Vestnik Nacional'noj akademii nauk Respubliki Kazahstan = National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2019, vol. 2, no. 378, pp. 6–13. (In Russ.)* doi: 10.32014/2019.2518-1467.35]
7. Кливлеева Н.Г., Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Шаменова М.Г., Саятов М.Х., Онгарбаева Н.С., Қалқожаева М.Қ., Баймухаметова А.М., Амирасева Л.К., Мустафин М.К., Мустафин Б.М., Баисеев Г.А. Обнаружение вирусов гриппа А (H1N1) у людей и свиней в регионе Северного Казахстана в 2014–2016 гг. // Известия НАН РК. Серия Биологическая. 2017. Т. 5, № 323. С. 106–114. [Klivelyeva N.G., Saktaganov N.T., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Shamenova M.G., Sayatov M.H., Ongarbayeva N.S., Kalkozhayeva M.K., Baimukhametova A.M., Amirasheva L.K., Mustafin M.K., Mustafin B.M., Baiseyev G.A. Detection of influenza A(H1N1) viruses in humans and pigs in the Northern Kazakhstan during 2014–2016. *Izvestiya NAN RK. Seria Biologicheskaya = News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Biological Series, 2017, vol. 5, no. 323, pp. 106–114. (In Russ.)*]
8. Лыткина И.Н., Волкова Н.А. Профилактика гриппа и острых респираторных вирусных инфекций среди эпидемиологически значимых групп населения // Лечащий врач. 2006. № 9. С. 83–85. [Lytkina I.N., Volkova N.A. Prevention of influenza and acute respiratory viral infections among epidemiologically significant population groups. *Lechashchiy vrach = Attending Physician, 2006, no. 9, pp. 83–85. (In Russ.)*]
9. Михайлов А.А., Дорецкий Л.И. Справочник практического врача. М.: Эксмо, 2007. 528 с. [Mikhailov A.A., Doretsky L.I. Handbook of a practitioner. *Moscow: Eksmo, 2007. 528 p. (In Russ.)*]
10. Ратникова Л.И., Степако Е.А. Новый подход к терапии острых респираторных вирусных инфекций и гриппа // Поликлиника. 2009. № 2. С. 70–72. [Ratnikova L.I., Stepako E.A. A new approach to the treatment of acute respiratory viral infections and influenza. *Poliklinika = Polyclinic, 2009, no. 2, pp. 70–72. (In Russ.)*]
11. Смагул М.А., Нусупбаева Г.Е., Айкимбаев А.М., Березин В.Э., Кливлеева Н.Г. Надзор за гриппом и острыми респираторными инфекциями в Казахстане // Медицина. 2018. № 8 (194). С. 25–31. [Smagul M.A., Nusupbayeva G.E., Aikimbayev A.M., Berezin V.E., Klivelyeva N.G. Oversight of influenza and acute respiratory infections in Kazakhstan. *Meditina = Medicine, 2018, no. 8 (194), pp. 25–31. (In Russ.)* doi: 10.31082/1728-452X-2018-194-8-25-31]
12. Шаменова М.Г., Кливлеева Н.Г., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Сактаганов Н.Т., Баймухаметова А.М., Онгарбаева Н.С., Қалқожаева М.Қ., Наурызалиева Ш.Т. Изучение популяционного иммунитета к вирусам гриппа А и В среди населения г. Алматы и Алматинской области в 2018 г. // Центральное-азиатский научно-практический журнал по общественному здравоохранению. 2019. № 3. С. 77–81. [Shamenova M.G., Klivelyeva N.G., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Baymukhametova A.M., Ongarbayeva N.S., Kalkozhaeva M.K., Nauryzaliev Sh.T. Study on herd immunity against influenza A and B

- viruses among the population of Almaty and Almaty Oblast in 2018. *Tsentral'no-aziatskiy nauchno-prakticheskiy zhurnal po obshchestvennomu zdравоохранeniyu = The Central Asian Scientific-Practical Journal on Public Health*, 2019, no. 3, pp. 77–81. (In Russ.)]
13. Этиология острых респираторных заболеваний. В кн.: Острые респираторные заболевания у детей. Лечение и профилактика: науч.-практ. программа. М.: Международный фонд охраны здоровья матери и ребенка, 2002. С. 10. [Etiology of acute respiratory diseases. In: Acute respiratory infections in children. Treatment and prevention: scientific and practical program. *Moscow: International Fund for Maternal and Child Health*, 2002, p. 10. (In Russ.)]
 14. Abed Y., Boivin G. Review of clinical influenza A and B infections with reduced susceptibility to both Oseltamivir and Zanamivir. *Open Forum Infect. Dis.*, 2017, vol. 4, no. 5: ofx105. doi: 10.1093/ofid/ofx105
 15. Foll M., Poh Y.P., Renzette N., Ferrer-Admetlla A., Bank C., Shim H., Malaspinas A.-S., Ewing G., Liu P., Wegmann D., Caffrey D.R., Zeldovich K.B., Bolon D.N., Wang J.P., Kowalik T.F., Schiffer C.A., Finberg R.W., Jensen J.D. Influenza virus drug resistance: a time-sampled population genetics perspective. *PLoS Genet.*, 2014, vol. 10(2): e1004185. doi: 10.1371/journal.pgen.1004185
 16. Korteweg C., Gu J. Pandemic influenza A (H1N1) virus infection and avian influenza A (H5N1) virus infection: a comparative analysis. *Biochem Cell Biol.*, 2010, vol. 88, pp. 575–587. doi: 10.1139/O10-017
 17. Memoli M.J., Athota R., Reed S., Czajkowski L., Bristol T., Proudfoot K., Hagey R., Voell J., Fiorentino C., Ademposi A., Shoham S., Taubenberger J.K. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, vol. 58, no. 2, pp. 214–224. doi: 10.1093/cid/cit725
 18. Rambaut A., Pybus O.G., Nelson M.I., Viboud C., Taubenberger J.K., Holmes E.C. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*, 2008, vol. 453, no. 7195, pp. 615–619. doi: 10.1038/nature06945
 19. Reperant L.A., Grenfell B.T., Osterhaus A.D. Quantifying the risk of pandemic influenza virus evolution by mutation and reassortment. *Vaccine*, 2015, vol. 33, no. 49, pp. 6955–6966. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.10.056
 20. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO Press, 2011. 153 p.

Авторы:

Кливлеева Н.Г., к.б.н., зав. лабораторией биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Онгарбаева Н.С., магистр естественных наук, научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Баймухаметова А.М., бакалавр общественного здравоохранения, лаборант лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Сактаганов Н.Т., магистр ветеринарии, научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Лукманова Г.В., магистр естественных наук, научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Глебова Т.И., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Саятов М.Х., д.б.н., профессор, академик НАН РК, главный научный сотрудник лаборатории экологии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Березин В.Э., д.б.н., профессор, член-корреспондент НАН РК, руководитель отдела вирусологии ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан;

Нусупбаева Г.Е., д.м.н., зав. референсной лабораторией вирусных инфекций Филиала «Научно-практического центра санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Алматы, Казахстан;

Айкимбаев А.М., д.м.н., профессор, советник по науке Филиала «Научно-практического центра санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Алматы, Казахстан.

Authors:

Klivelyeva N.G., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Ongarbayeva N.S., Master of Natural Sciences, Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Baimukhametova A.M., Bachelor of Public Health, Assistant of the Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Saktaganov N.T., Master of Veterinary Sciences, Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Lukmanova G.V., Master of Natural Sciences, Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Glebova T.I., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Biochemistry, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Sayatov M.Kh., PhD, MD (Biology), Professor, Academician of National Academy of Sciences of the Kazakhstan Republic, Head Researcher, Laboratory of Viral Ecology, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Berezin V.E., PhD, MD (Biology), Professor, Associate Member of National Academy of Sciences of the Kazakhstan Republic, Head of the Department of Virology, Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

Nusupbaeva G.E., PhD, MD (Medicine), Head of the Reference Laboratory of Viral Infections, Scientific and Practical Center for Sanitary and Epidemiological Examination and Monitoring, Branch of the RSE on REM National Center for Public Health of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan;

Aikimbayev A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Science Adviser, Scientific and Practical Center for Sanitary and Epidemiological Examination and Monitoring, Branch of the RSE on REM National Center for Public Health of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 18.12.2019
Отправлена на доработку 13.02.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 18.12.2019
Revision received 13.02.2020
Accepted 11.03.2020

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ НАНАЙСКОГО РАЙОНА ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

В.О. Котова¹, Л.А. Балахонцева¹, Е.А. Базыкина¹, О.Е. Троценко¹, В.Н. Бельды², С.Е. Кирдяшова²

¹ ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия

² КГБУЗ Троицкая центральная районная больница МЗ Хабаровского края, с. Троицкое, Нанайский район, Хабаровский край, Россия

Резюме. Изучение генетического разнообразия вируса гепатита С (HCV) имеет большое практическое значение при проведении молекулярно-эпидемиологических исследований, разработке средств специфической профилактики и для определения тактики терапии. Цель исследования — провести анализ генетического разнообразия HCV, циркулирующего среди населения Нанайского района Хабаровского края. *Материалы и методы.* Проведен молекулярно-генетический анализ 124 образцов плазмы крови от пациентов с диагнозом хронический гепатит С (ХГС), проживающих на территории Нанайского района Хабаровского края. *Результаты.* РНК HCV была обнаружена в 84 (67,7±4,2%) образцах плазмы крови. Генотипирование HCV, проведенное с использованием набора «АмплиСенс-1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) показало, что на территории района наиболее распространен 3 генотип вируса — 47,6±5,4% (n = 40). Генотип 1 HCV обнаружен у 30 пациентов (35,7±5,2%). В 13 случаях (15,5±3,9%) выявлен 2 генотип и у 1 пациента (1,2±1,2%) генотип не определился. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b генома HCV, проведенный для 60 РНК HCV-положительных образцов, показал следующее соотношение субтипов: 1a — 2 (3,3±2,3%), 1в — 23 (38,3±6,3%), 2a — 6 (10±3,9%), 2с — 2 (3,3±2,3%), 3a — 27 (45±6,4%). В ходе исследования было выявлено 3 пробы, принадлежащие к рекомбинантной форме вируса RF2k/1b. С целью подтверждения рекомбинации были получены полные нуклеотидные последовательности гена NS2. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости проведения дополнительного комплексного обследования больных хроническими формами гепатита С с применением современных молекулярно-биологических методов для принятия решений об адекватной терапии, учитывая особенности выделенных изолятов. Данные о молекулярно-генетических характеристиках HCV, циркулирующих на отдельных территориях Дальнего Востока, весьма ограничены, и проведенное молекулярно-генетическое исследование дополнит в существующие представления о циркуляции геновариантов HCV на территориях Российской Федерации.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип, субтип, рекомбинантные формы, хронический гепатит С, филогенетический анализ.

Адрес для переписки:

Котова Валерия Олеговна
680000, Россия, г. Хабаровск, ул. Шевченко, 2,
Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (4212) 46-18-54.
E-mail: kotova.valeriya@mail.ru

Contacts:

Valeriya O. Kotova
680000, Russian Federation, Khabarovsk, Shevchenko str., 2,
Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (4212) 46-18-54.
E-mail: kotova.valeriya@mail.ru

Для цитирования:

Котова В.О., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Бельды В.Н., Кирдяшова С.Е. Генетическое разнообразие вируса гепатита С среди населения Нанайского района Хабаровского края // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 148–156. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1265

Citation:

Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A., Trotsenko O.E., Beldy V.N., Kirdyashova S.E. Genetic diversity of hepatitis C virus in Nanaian region, Khabarovsk territory // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 148–156. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1265

GENETIC DIVERSITY OF HEPATITIS C VIRUS IN NANAIAN REGION, KHABAROVSK TERRITORYKotova V.O.^a, Balakhontseva L.A.^a, Bazykina E.A.^a, Trotsenko O.E.^a, Beldy V.N.^b, Kiryashova S.E.^b^a Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Khabarovsk, Russian Federation^b Troitsk central regional hospital of the Ministry of Healthcare of the Khabarovsk Krai, Troitskoe, Nanaisky region of the Khabarovsk krai, Russian Federation

Abstract. Examining hepatitis C virus (HCV) genetic diversity is of great practical value in molecular-epidemiological research, development of specific prevention tools and outlining therapeutic strategy. Aim of study is to conduct analysis assessing HCV genetic diversity circulating in the Nanaisky Region population of the Khabarovsk Krai. *Materials and methods.* Molecular and genetic analysis of 124 blood plasma samples collected from patients with chronic hepatitis C and residing in the Nanaisky Region was conducted. *Results.* HCV RNA was detected in 84 (67.7±4.2%) plasma samples. HCV genotyping was performed by using AmpliSens — 1/2/3 kit (Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation) showing that genotype 3 dominated reaching up to 47.6±5.4% (n = 40). Genotype 1 was detected in 30 patients (35.7±5.2%). In thirteen cases (15.5±3.9%) genotype 2 was identified, whereas in one case (1.2±1.2%) virus genotype was unidentified. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences in HCV NS5B region was performed for 60 HCV RNA-positive samples showing subtype ratio as follows: 1a — 2 (3.3±2.3%), 1b — 23 (38.3±6.3%), 2a — 6 (10.0±3.9%), 2c — 2 (3.3±2.3%), 3a — 27 (45.0±6.4%). Three samples of RF2k/1b recombinant virus were found. A full NS2 gene nucleotide sequence was cloned in order to confirm the recombination event. The results of the study evidence about a need to conduct multi-layered examination of patients with chronic hepatitis C by using current molecular and biologic methods for assigning proper therapy coupled to characteristics of the isolated strains. The data regarding hepatitis C virus molecular and genetic parameters circulating in the Far Eastern Federal District, Russia, are rather limited. Hence, our study would contribute to current understanding of HCV genovariants circulating in territories of the Russian Federation.

Key words: hepatitis C virus, genotype, subtype, recombinant forms, chronic hepatitis C, phylogenetic analysis.

Введение

Гепатит С (ГС) продолжает оставаться одной из актуальных проблем здравоохранения всего мира и характеризуется широкой распространенностью, отсутствием вакцинопрофилактики, частым развитием хронических форм заболевания с возможностью формирования таких неблагоприятных исходов, как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома, от которых ежегодно в мире погибает более 400 000 человек. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во всем мире вирусом гепатита С поражены 71 млн человек [25].

Вирус гепатита С (HCV) отличается высокой степенью генетической variability, что не только затрудняет разработку эффективных методов специфической профилактики, но и способствует быстрому формированию вариантов вируса, устойчивых к действию противовирусных препаратов. В настоящее время на основе филогенетического анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей изоляты HCV подразделяют на 8 генотипов и 89 подтвержденных субтипов [10, 13, 22]. Геномы среди генотипов HCV отличаются друг от друга примерно на 30–35%, а различия между субтипами составляют 15–20% [11, 24]. Субтипы включают в себя изоляты, состоящие из квазивидов — совокупности генетически близких вариантов вируса, структурно и антигенно отличающихся

между собой, в пределах одного индивидуума. Генетическая variability квазивидов достигает 1–3% [17].

Для каждого генотипа характерна определенная частота встречаемости и географическая зона распространения. Так, на долю генотипа 1, который имеет 13 субтипов (1a–1o), приходится больше всего случаев заболеваемости ГС в мире — 83,4 млн (46,2%). Наиболее распространенными субтипами являются субтипы 1a и 1b, которые встречаются повсеместно. Следующим наиболее распространенным геновариантом вируса является 3 генотип HCV, который, по оценкам исследователей, составляет 54,3 млн (30,1%) случаев заболеваемости ГС в мире и встречается в Центральной и Южной Азии, Латинской Америке и Восточной Европе. На долю генотипов 2, 4 и 6, которые имеют ограниченное географическое распределение, приходится большая часть оставшихся случаев инфицирования, с распространенностью, оцениваемой в 9,1; 8,3 и 5,4% соответственно. Частота распространения 5 генотипа составляет < 1% [20]. 2 генотип вируса чаще встречается в странах Азии и Западной Африки, в то время как высокая частота инфицирования 4 генотипом происходит в Центральной, Восточной и Северной Африке, а также на Ближнем Востоке. Генотип 5 распространен в Южной Африке, генотип 6, имеющий наибольшее количество субтипов, — в Восточной и Юго-Восточной Азии, 7 — в Центральной Африке.

В 2018 г. в Канаде у выходцев из штата Пенджаб (Индия) был выявлен 8 генотип вируса [10].

В 2002 г. в Санкт-Петербурге был обнаружен первый межгенотипный рекомбинантный вариант HCV — RF2k/1b, структурная часть генома которого образована субтипом 2k, а неструктурная — субтипом 1b вируса [14, 15]. В 2005 г. рекомбинантная форма RF2k/1b была включена в классификацию HCV как отдельная номенклатурная единица — RF 01_1b2k (рекомбинантная форма), а в 2009 — как CRF 01_1b2k (циркулирующая рекомбинантная форма) [1, 16, 21]. В настоящее время это единственный рекомбинантный вариант HCV, который широко распространен в мире и имеет эпидемиологическое значение. Современная классификация HCV включает 9 межгенотипных рекомбинантных форм [13]. Изучение рекомбинации HCV имеет большое значение в клинической практике, поскольку такие варианты вируса могут сочетать в себе разные свойства родительских генотипов, в том числе в плане ответа на интерфероновую терапию [3].

Изучение распространения генотипов HCV на территориях Российской Федерации проводится с середины 1990-х гг. [4]. По результатам молекулярно-генетических исследований установлено, что на территории Российской Федерации доминируют генотипы 1в и 3а [5, 6, 7, 8]. Необходимо отметить, что несмотря на проводимые исследования, данные о распределении генотипов на отдельных территориях Российской Федерации весьма ограничены, особенно это касается отдаленных районов Дальнего Востока.

Определение генотипической принадлежности HCV играет важную роль при выборе тактики проводимой терапии. Известно, что пациенты, инфицированные HCV субтипа 1b, хуже отвечают как на терапию пегелированным интерфероном и рибавирином, так и на терапию некоторыми препаратами прямого противовирусного действия, в отличие от пациентов, инфицированных HCV генотипов 2 и 3 [2].

Проведение молекулярно-генетического мониторинга, включающего анализ территориальной специфики распространения различных генетических вариантов HCV, является важной составной частью системы эпидемиологического надзора за распространением вирусных гепатитов, а также имеет решающее значение для разработки средств специфической профилактики, диагностических тест-систем и совершенствования методов проводимой терапии.

Цель работы — провести анализ генетического разнообразия вируса гепатита С, циркулирующего у коренного населения Нанайского района Хабаровского края.

Материалы и методы

В работе была использована коллекция образцов плазмы/сыворотки крови от 124 пациентов с подозрением на хронический вирусный гепатит С (ХГС), которые в 2017–2018 гг. были направлены врачом-инфекционистом КГБУЗ Троицкая центральная районная больница в лабораторию эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора для проведения исследования. От всех пациентов были получены информированные согласия на участие в исследовании, которое было одобрено Комитетом по этике ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора. Сбор образцов крови был осуществлен на базе КГБУЗ Троицкая центральная районная больница.

Среди обследованных было 69 женщин (55,6±4,5%) и 55 мужчин (44,4±4,5%). Средний возраст пациентов составил 47,4±1,5 лет. Национальный состав исследуемой группы был следующим: 66,1% (n = 82) — русские, 30,6% (n = 38) — нанайцы, 1,6% (n = 2) — удэгейцы. Среди обследованных была 1 иранка (0,8%) и 1 ульчанка (0,8%).

Все образцы сывороток крови были протестированы на наличие маркеров вирусного гепатита С: антитела к вирусу гепатита С — анти-ВГС (IgG+IgM), с проведением подтверждающего теста, анти-ВГС IgM. Сыворотки крови исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест», согласно инструкциям производителя.

Выделение нуклеиновых кислот из 100 мкл плазмы крови производили с использованием комплекта реагента «АмплиПрайм РИБО-преп» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Первичный анализ на выявление РНК HCV, определение вирусной нагрузки и генотипа вируса проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® HCV-FL», «АмплиСенс® HCV-Монитор-Fl» и «АмплиСенс-1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) с использованием прибора Rotor Gene Q (Qiagen, Германия), согласно инструкциям производителя. Обратную транскрипцию для получения кДНК проводили с применением коммерческого набора Реверта-Л (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Для 60 РНК HCV-положительных образцов с целью получения нуклеотидных последова-

Таблица. Праймеры, используемые для амплификации фрагмента NS5b генома ВГС

Table. Primers used during the amplification of the HCV NS5b fragment of the genome

№	Последовательность (5'→3') Sequence (5'→3')	Направление Direction	Положение в геноме Position in the genome
1	TATGAYACCCGCTGYTTTGAC	Прямой	8256–8275
	GARTACCTRGTCATAGCCTC	Обратный	8622–8641
2	CTGYTTTGACTCMACRGTCAAC	Прямой	8267–8287
	ATAGCCTCCGTGAAGRCTC	Обратный	8611–8630

тельностью фрагмента области NS5b генома HCV была проведена двухступенчатая ПЦР со специфическими праймерами (Синтол, Россия) к данному участку генома, взятыми из литературных источников.

Условия для обоих раундов ПЦР были следующими: 95°C — 2 мин, затем 30 циклов: денатурация при 95°C — 30 с, отжиг при 60°C — 30 с и удлинение цепи при 72°C — 1 мин. Полученный в ходе ПЦР продукт величиной 320 п.н. определяли в электрофорезе в 2% агарозном геле.

Для амплификации области гена NS2 были выбраны пары праймеров для первого раунда: 5'-CAAATGGGAATGGGTGGTCCTCCTGTT TCTRCTCCTYGCG и 5'-CCACCCCTGCCCT TCAAGGCTATCGGCYGGSCCAG; второго раунда: 5'-ACTCCTTGCGGACGCCAGAGTC TCGCGGTGCTTGTGGATG и 5'-CCGGCCC CAGAAATATCTCCCTCCCCCTTCGGGCGG AGAC [8]. Использовали следующие условия ПЦР для амплификации фрагмента гена NS2: 1-й раунд: 95°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 45 с, 30 циклов; 2-й раунд: 95°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 30 с, 30 циклов. Полученный в ходе ПЦР продукт величиной 760 п.н. определяли в электрофорезе в 2% агарозном геле.

Для определения нуклеотидной последовательности анализируемых фрагментов вирусного генома проводили прямое секвенирование

ампликонов на ДНК-анализаторе модели 3500 (Applied Biosystems/Life Technologies, США). Секвенирование осуществляли с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems/Life Technologies, США) согласно протоколу производителя.

Для выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей использовалась программа BioEdit v.7.1.9.

Для идентификации близкородственных штаммов HCV полученные нуклеотидные последовательности анализировались в программе BLAST в сравнении с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6.0, путем построения филогенетических деревьев методом «ближайших соседей» (neighbor-joining) [23]. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. Для оценки статистической достоверности филогенетических связей использовали бутстрэп (bootstrap) анализ для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

Для определения предполагаемой точки рекомбинации нуклеотидные последовательности исследовали методом Bootscan-анализа с применением программы SimPlot.

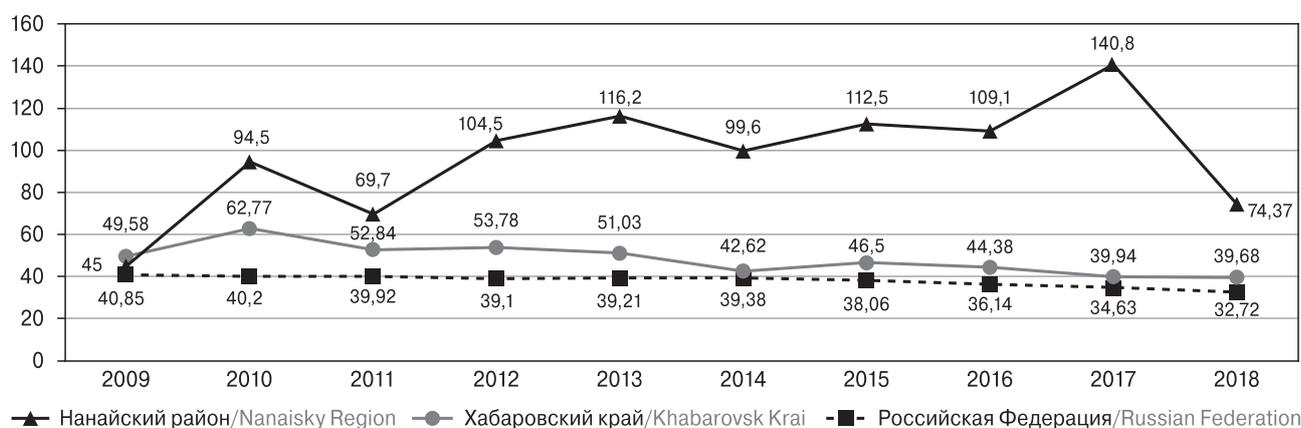
**Рисунок 1. Динамика заболеваемости хроническим вирусным гепатитом С в РФ, Хабаровском крае и Нанайском районе в 2009–2018 гг. (на 100 тыс. населения)**

Figure 1. Chronic viral hepatitis C incidence dynamics in the Russian Federation, Khabarovsk Krai and Nanaisky Region during 2009–2018 years (per 100 000 general population)

Результаты

Нанайский район является административно-территориальным районом Хабаровского края. Численность населения района по состоянию на 01.01.2018 составляла 15 962 человека, из них 4752 — представители коренных малочисленных народов Севера.

На протяжении почти всего анализируемого 10-летнего периода (2009–2018 гг.) заболеваемость ХГС в районе была выше, чем в целом по стране и в среднем по Хабаровскому краю (рис. 1). За последние два года наблюдения показатели заболеваемости ХГС превысили уровни Хабаровского края в 3,6 и 1,9 раза, среднефедеральные уровни — в 4,1 и 2,3 раза соответственно в 2017 и 2018 гг.

Во всех исследуемых пробах были выявлены антитела к вирусному гепатиту С: анти-ВГС (IgG+IgM). Анти-ВГС IgM были обнаружены у 51 пациента (41,1±4,4%).

РНК HCV была выявлена в 84 (67,7±4,2%) образцах плазмы крови. Во всех РНК-положительных пробах был определен уровень вирусной нагрузки. У 35 (41,7±5,4%) пациентов он был низкий (менее 8×10^5 МЕ/мл), у 49 (58,3±5,4%) — высокий (более 8×10^5 МЕ/мл). Генотипирование, проведенное с использованием набора «АмплиСенс-1/2/3», показало, что на территории района наиболее распространен HCV Гт3 — 47,6±5,4% (в 40 из 84 РНК-HCV-положительных проб). HCV Гт1 обнаружен у 30 пациентов (35,7±5,2%). В 13 случаях (15,5±3,9%) выявлен HCV Гт2 и у 1 пациента (1,2±1,2%) генотип определить не удалось по причине низкой вирусной нагрузки (рис. 2).

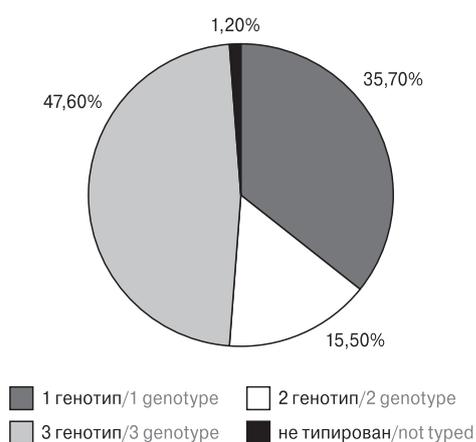


Рисунок 2. Распределение различных вариантов генотипов ВГС у больных хроническим гепатитом С в Нанайском районе Хабаровского края (n = 84)

Figure 2. HCV genotypes distribution among patients with chronic hepatitis C in the Nanaisky Region of the Khabarovsk Krai (n = 84)

В ходе проведенного исследования различий в структуре циркулирующих геновариантов и субтипов HCV среди этнических групп (коренных народностей Крайнего Севера и пришлового русскоязычного населения) обнаружить не удалось.

Для установления генетических взаимоотношений между отдельными образцами и возможного родства вариантов HCV, циркулирующих на исследуемой территории, с изолятами из других регионов Российской Федерации и стран ближнего и дальнего зарубежья, были получены и изучены нуклеотидные последовательности области NS5b генома (РНК зависящая РНК полимеразы) от 60 пациентов с диагнозом ХГС. Данный регион генома используется многими исследователями для уточнения взаимосвязи между отдельными изолятами ВГС. В качестве референс-штаммов для анализа использовали последовательности той же области генома HCV, полученные в России и других странах мира и представленные в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b генома HCV, проведенный для 60 исследованных образцов, показал следующее соотношение субтипов: 1a — 2 (3,3±2,3%), 1b — 23 (38,3±6,3%), 2a — 6 (10±3,9%), 2c — 2 (3,3±2,3%), 3a — 27 (45±6,4%). Филогенетические отношения между исследованными образцами и референсными последовательностями представлены на рис. 3.

На филогенетическом дереве 2 образца 1 генотипа (2031, 4794) оказались идентичными между собой и с высоким уровнем bootstrap-поддержки (99%) образовали единый кластер с изолятами, принадлежавшими 1a субтипу из США (EF407457, где данный геновариант является эндемичным) и Италии (KF667809), выделенными соответственно в 2007 и 2012 гг., а также с образцом из Санкт-Петербурга (AF388435.1).

Исследуемые нами штаммы геноварианта 1b на филогенетическом дереве не сформировали отдельных кластеров, а равномерно распределились между штаммами HCV данного субтипа, представленными в международной базе данных GenBank из России (Республика Саха — Якутия, Новосибирская область, Санкт-Петербург) и стран ближнего и дальнего зарубежья (Узбекистан, Таджикистан, Греция, США, Германия, Италия, Китай, Бразилия). Можно предположить, что варианты 1b субтипа распространялись на территории Нанайского района преимущественно независимыми путями, что подтверждается отсутствием крупных кластеров.

Филогенетический анализ 27 образцов, отнесенных по результатам генотипирования к генотипу 3, показал, что все полученные нами нуклеотидные последовательности кластери-

зуются на одной ветви филогенетического дерева с ранее полученными последовательностями той же области генома вариантов субтипа 3a, выделенными в разные годы в различных регионах Российской Федерации и мира. Для популяции HCV субтипа 3a, циркулирующей на изучаемой нами территории, характерными оказались высокая генетическая гомогенность и отсутствие выраженной кластеризации по какому-либо признаку.

Филогенетический анализ 8 образцов, отнесенных по результатам предварительного генотипирования к генотипу 2, выявил формирование двух кластеров. Один из них был сформиро-

ван 6 полученными в настоящем исследовании нуклеотидными последовательностями (образцы № 2814, 1839, 3114, 2778, 4791, 2779) и генетически близкими последовательностями субтипа 2a HCV, зарегистрированными в GenBank, которые были выделены на территории Новосибирской области в 2002 г. (GQ389001.1), в Республике Саха (Якутия) (КТ 378626.1) в 2014 г., в Ленинградской области (AF388438.1) в 2014 г., а также во Франции (MG453401.1) в 2014 г. Два штамма (образцы № 4121, 4674) сгруппировались на филогенетическом дереве, образуя еще один общий кластер с изолятами HCV Гт 2с из Новосибирской области, Германии и Аргентины.

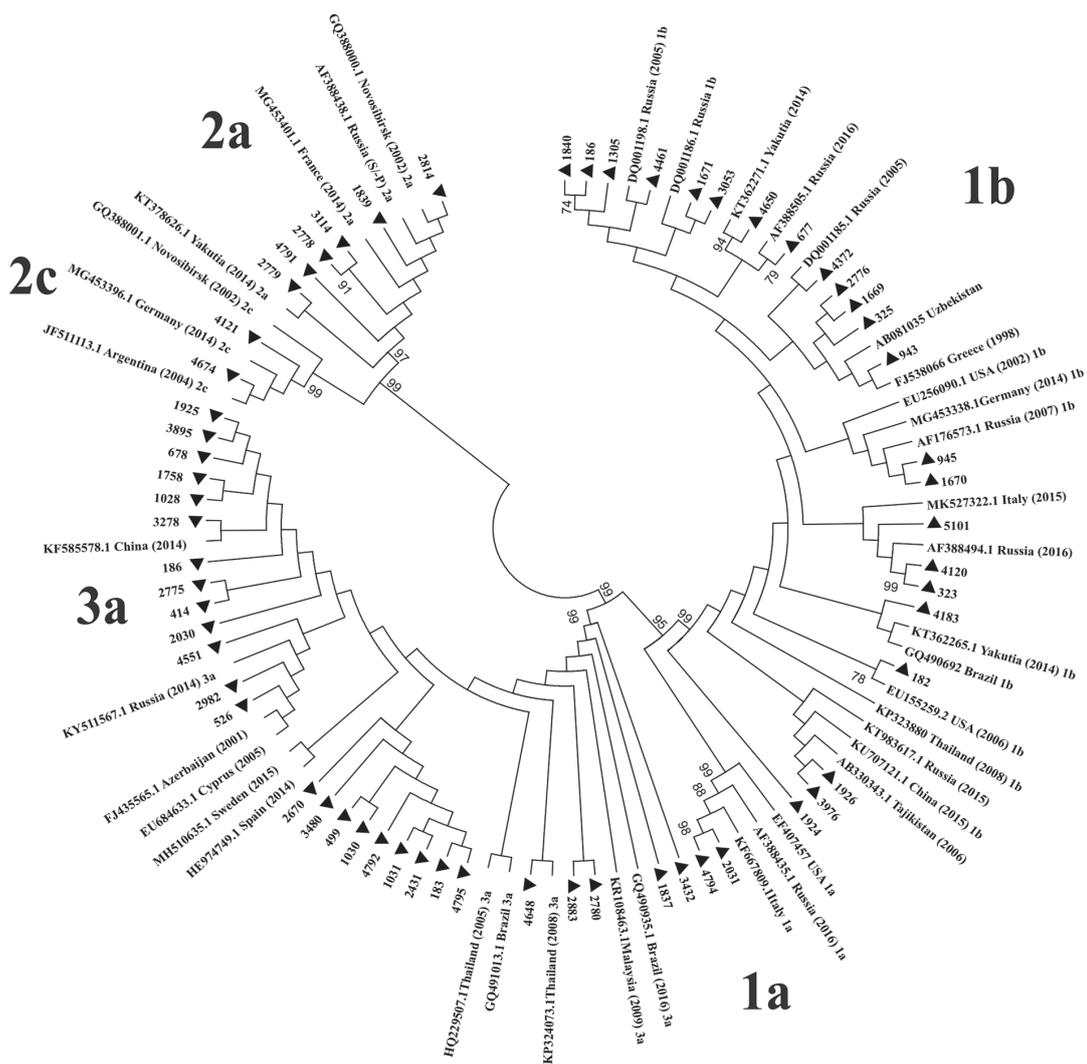


Рисунок 3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей области NS5b HCV, циркулирующих среди населения Нанайского района Хабаровского края, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референтными последовательностями
 Figure 3. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the NS5B HCV region circulation among population of the Nanaisky Region of the Khabarovsk Krai compared to reference sequences presented in the international database GenBank

Примечание. Филогенетическое дерево построено по алгоритму neighbour-joining. Последовательности HCV, изученные в данной работе, выделены треугольниками. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%.
 Note. The phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining algorithm. HCV sequences investigated in the current work are presented as triangles. The indicated bootstrap values are 70% of higher.

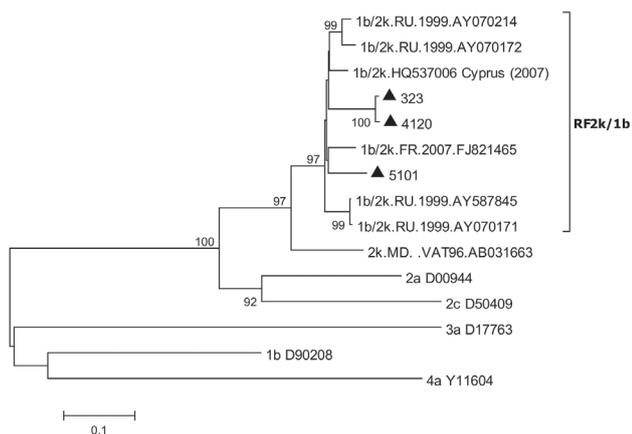


Рисунок 4. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей региона NS2 генома HCV рекомбинантных вариантов RF2k/1b, выделенных от пациентов с ХГС, проживающих на территории Нанайского района Хабаровского края, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями

Figure 4. Phylogenetic tree of the nucleotide sequences of the NS2 HCV region of the RF2k/1b recombinant variants isolated from patients with chronic viral hepatitis C and residing in the Nanaisky Region of the Khabarovsk Krai, compared to reference sequences presented in the international database GenBank

Примечание. Филогенетическое дерево построено по алгоритму neighbour-joining. Последовательности HCV, изученные в данной работе, выделены треугольниками. Указаны значения бутстрэп-индекса, превышающие 70%. Note. The phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining algorithm. HCV sequences investigated in the current work are presented as triangles. The indicated bootstrap values are 70% of higher.

Анализ трех исследуемых нами образцов (4120, 323, 5101), проведенный с использованием тест-системы «АмплиСенс-1/2/3» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), показал их принадлежность к субтипу 2, а при филогенетическом анализе фрагмента области NS5b генома HCV данные пробы группировались в кластер, сформированный изолятами 1b субтипа. Полученные результаты позволили предположить наличие рекомбинантного геноварианта CRF01_2k1b у обследованных пациентов Нанайского района.

С целью подтверждения рекомбинации субтипов 2k/1b для изолятов 323, 4120 и 5101 была определена полная нуклеотидная последовательность гена NS2, где по данным литературы могут располагаться точки рекомбинации [14]. Размер секвенированного фрагмента составил 760 н.о. Результаты проведенного нами анали-

за с использованием метода Bootscan-анализа подтвердили наличие точки перекреста для всех трех образцов.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей региона NS2 HCV показал высокую степень гомологии между рекомбинантными изолятами ВГС RF2k/1b, полученными в ходе настоящего исследования от русскоговорящих жителей Нанайского района, и ранее выявленными изолятами в Санкт-Петербурге, Франции и на Кипре [12, 15, 18] (рис. 4).

Нуклеотидные последовательности образцов 323 и 4120 достоверно сгруппировались на филогенетическом дереве, образуя общий кластер, что свидетельствует о высокой генетической близости исследуемых образцов, не исключающей эпидемиологической связи между ними. Анализ эпидемиологических данных показал, что пациент (323) являлся в прошлом потребителем инъекционных наркотиков, а предполагаемый путь инфицирования пациентки (4120) — половой от супруга, который также употреблял внутривенно наркотические препараты. Пациентка (5101), у которой была обнаружена рекомбинантная форма RF2k/1b, имела в анамнезе многочисленные оперативные вмешательства и ранее проживала в Грузии, где распространенность этого варианта достаточно высока [1].

Рутинные методы генотипирования, используемые в настоящее время в клинических лабораториях, не позволяют определять рекомбинантные варианты вируса, поскольку в коммерческих тест-системах для идентификации генотипов в качестве мишени используется только один фрагмент вируса 5'UTR/core. Этого недостаточно для определения рекомбинантных форм [1].

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения дополнительного обследования больных хроническими формами ГС с применением молекулярно-биологических методов для принятия решений об адекватной терапии, учитывая особенности выделенных изолятов.

Заключение

Впервые проведенное молекулярно-генетическое исследование вируса гепатита С, циркулирующего на территории Нанайского района Хабаровского края, показало, что среди обследованных пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» циркулируют субтипы: 1a, 1b, 2a, 2c 3a, с преобладанием 3a. Кроме того, на территории района зафиксировано 3 случая естественной рекомбинации HCV типа 2k/1b. Полученные нуклеотидные последовательности гена NS2 депонированы в базу данных GenBank под номерами MN366020-MN366022.

Проведение молекулярно-генетического мониторинга за циркулирующими на каждой отдельной территории генотипами/субтипами вируса имеет не только клиническое значение, но и играет важную роль в решении вопросов эпидемиологического надзора за вирусным гепатитом С.

Полученные результаты молекулярно-генетического исследования внесут значительное

дополнение в существующие представления о циркуляции геновариантов HCV на территориях Российской Федерации.

Для установления региональных особенностей и получения полной картины генетической структуры изолятов HCV, циркулирующих на территории Хабаровского края, необходимо проведение регулярного молекулярно-генетического мониторинга.

Список литературы/References

1. Дементьева Н.Е., Калинина О.В., Знойко О.О., Беляков Н.А., Жебрун А.Б. Циркулирующая рекомбинантная форма вируса гепатита С RF2k/1b: проблемы диагностики и терапии // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016. Т. 8, № 1. С. 42–52. [Demytyeva N.Ye., Kalinina O.V., Znoyko O.O., Belyakov N.A., Zhebrun A.B. The circulating recombinant form RF2k/1b of hepatitis C virus: problems in diagnostics and therapy. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 42–52. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2016-8-1-42-52
2. Кравченко А.В., Куимова У.А., Ганкина Н.Ю., Канестри В.Г., Чуланов В.П. Предикторы устойчивого вирусологического ответа при терапии хронического гепатита пегилированным интерфероном и рибавирином у больных ВИЧ-инфекцией // Инфекционные болезни. 2014. Т. 12, № 2. С. 30–34. [Kravchenko A.V., Kuimova U.A., Gankina N.Yu., Kanestri V.G., Chulanov V.P. Predictors of sustained virologic response in therapy of chronic hepatitis with pegylated interferon and ribavirin in patients with HIV infection. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 30–34. (In Russ.)]
3. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов. М.: Икар, 2013. 336 с. [Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. Molecular biological basis of viral hepatitis control. Moscow: Ikar, 2013. 336 p. (In Russ.)]
4. Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С., Тсуда Ф., Селиванов Н.А., Окамото Х., Стаханова В.М. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ // Вопросы вирусологии. 1997. № 4. С. 157–161. [Lvov D.K., Samokhvalov E.I., Mishiro S., Tsuda F., Selivanov N.A., Okamoto H. Regularities in the spread of hepatitis C virus and its genotypes in Russian and countries within the former USSR. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1997, no. 4, pp. 157–161. (In Russ.)]
5. Мукомолов С.Л., Левакова Л.Г., Сулягина Е.В., Синайская Е.В., Болсун Д.Д., Иванова Н.В. Современная эпидемиология гепатита С в России // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012. № 6. С. 21–25. [Mukomolov S.L., Levakova L.G., Sulyagina E.V., Sinayskaya E.V., Bolsun D.D., Ivanova N.V. Current epidemiology of hepatitis C in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktualnie voprosi = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2012, no. 6, pp. 21–25. (In Russ.)]
6. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В., Бичурина М.А., Козлов А.В., Мукомолов С.Л., Тотолян А.А. Молекулярно-эпидемиологические особенности изолятов вируса гепатита С из разных регионов Республики Саха (Якутия) // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 359–372. [Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Gerasimova V.V., Bichurina M.A., Kozlov A.V., Mukomolov S.L., Totolian A.A. Molecular epidemiology features of hepatitis C virus isolates from different regions of the republic Sakha (Yakutia). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 359–372. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-359-372
7. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В., Игнатьева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 2. С. 56–64. [Soboleva N.V., Karlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.B., Isaeva O.V., Ignatieva M.E., Romanenko V.V., Oorzhak N.D., Malinnikova E.Yu., Kuregyan K.K., Mikhailov M.I. The prevalence of the hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation. *Zhurnal infekologii = Journal of Infectology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 56–64. (In Russ.)]
8. Чуб Е.В., Кочнева Г.В., Гранитов В.М., Нетесов С.В. Рекомбинанты вируса гепатита С типа 2k/1b у населения Алтайского края // Инфекционные болезни. 2007. Т. 5, № 4. С. 5–11. [Chub E.V., Kochneva G.V., Granitov V.M., Netesov S.V. Recombinants of hepatitis C virus type 2k/1b in the population of the Altai region. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2007, vol. 5, no. 4, pp. 5–11. (In Russ.)]
9. Чуланов В.П., Пименов Н.Н., Мамонова Н.А., Сагалова О.И., Шестакова И.В., Покровский В.И. Хронический гепатит С как проблема здравоохранения России сегодня и завтра // Терапевтический архив. 2015. № 11. С. 5–10. [Chulanov V.P., Pimenov N.N., Mamonova N.A., Sagalova O.I., Shestakova I.V., Pokrovsky V.I. Chronic hepatitis C in Russia: current challenges and prospects. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic archive*, 2015, no. 11, pp. 5–10. (In Russ.)]
10. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., Subramanian M.G., McHutchison J.G., Mo H., Svarovskaia E., Shafraan S.D. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.*, 2018, vol. 218, no. 11, pp. 1722–1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401
11. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J. Hepatol.*, 2016, vol. 65, no. 1, pp. S2–S21. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.035
12. Demetriou V.L., Kyriakou E., Kostrikis L.G. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. *Adv. Virol.*, 2011: 710438, 7 p. doi: 10.1155/2011/710438
13. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019. URL: <https://talk.ictvonline.org> (30.05.2019)
14. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L.O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 8, pp. 4034–4043. doi: 10.1128/jvi.76.8.4034-4043.2002

15. Kalinina O., Norder H., Magnius L.O. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St. Petersburg: proposed mechanism for its formation. *J. Gen. Virol.*, 2004, vol. 85, no. 7, pp. 1853–1857. doi: 10.1099/vir.0.79984-0
16. Kuiken C., Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol. Biol.*, 2009, no. 510, pp. 33–53. doi: 10.1007/978-1-59745-394-3_4
17. Messina J., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 77–87. doi: 10.1002/hep.27259
18. Morel V., Descamps V., François C., Fournier C., Brochet E., Capron D., Duverlie G., Castelain S. Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed hepatitis C infection: a case report. *J. Clin. Virol.*, 2010, vol. 47, no. 4, pp. 382–386. doi: 10.1016/j.jcv.2010.01.011
19. Rajhi M., Ghedira K., Chouikha A., Djebbi A., Cheikh I., Ben Yahia A., Sadraoui A., Hammami W., Azouz M., Ben Mami N., Triki H. Phylogenetic analysis and epidemic history of hepatitis C virus genotype 2 in Tunisia, North Africa. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 4: e0153761. doi: 10.1371/journal.pone.0153761
20. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J. Gen. Virol.*, 2004, vol. 85, no. 11, pp. 3173–3188. doi: 10.1099/vir.0.80401-0
21. Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deléage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspé G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlowsky J.M., Penin F., Sablon E., Shin-I T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J., Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2005, vol. 42, no. 4, pp. 962–973. doi: 10.1002/hep.20819
22. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T., Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 318–327. doi: 10.1002/hep.26744
23. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski 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
24. Thong V.D., Akkarathamrongsin S., Poovorawan K. Hepatitis C virus genotype 6: virology, epidemiology, genetic variation and clinical implication. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 2927–2940. doi: 10.3748/wjg.v20.i11.2927
25. WHO. Global hepatitis report, 2017. Geneva: WHO, 2017. 83 p. URL: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en> (15.05.2019)

Авторы:

Котова В.О., старший научный сотрудник, зав. лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа, Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Балахонцева Л.А., руководитель Дальневосточного окружного центра по профилактике и борьбе со СПИДом, Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Базыкина Е.А., младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа, Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Троценко О.Е., д.м.н., директор Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Бельды В.Н., врач-инфекционист, КГБУЗ «Троицкая центральная районная больница», г. Хабаровск, Россия;

Кирдяшова С.Е., главный врач КГБУЗ «Троицкая центральная районная больница», г. Хабаровск, Россия.

Authors:

Kotova V.O., Senior Researcher, Head of the Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Balakhontseva L.A., Head of the Far Eastern Regional Center on Prevention and Combat Against AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Bazykina E.A., Junior Researcher, Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Trotsenko O.E., PhD, MD (Medicine), Head of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Beldy V.N., Infectologist, Troitsk Central Regional Hospital, Khabarovsk, Russian Federation;

Kirdyashova S.E., Head Physician of the Troitsk Central Regional Hospital, Khabarovsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.09.2019
Отправлена на доработку 09.05.2020
Принята к печати 03.06.2020

Received 02.09.2019
Revision received 09.05.2020
Accepted 03.06.2020

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ИНТЕРФЕРОНОВОЙ ЗАЩИТЫ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Е.А. Кукушкина¹, С.И. Котелева¹, М.С. Бляхер¹, И.М. Федорова¹,
З.К. Рамазанова¹, Н.Н. Зверева², Е.В. Новосад², А.А. Самков³, М.В. Базарова³

¹ ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. Проведен анализ состояния интерфероновой системы 38 детей в остром периоде инфекционного мононуклеоза (ИМ), вызванного вирусом Эпштейна–Барр. Исследование интерфероновой системы выполнено по методике Ф.И. Ершова, которая предполагает оценку количества интерферона, находящегося в сыворотке крови или продуцируемого клетками крови, по его биологической активности. Целью работы было получение лабораторного обоснования для применения интерферонов или интерферогенов в комплексной терапии ИМ. Для этого было проведено сравнение интерфероновой системы у детей в остром периоде ИМ не только с показателями контрольной группы здоровых (30 детей 3–6 лет и 20 детей 7–14 лет, которые были обследованы ранее для создания внутрилабораторной нормы), но и с показателями группы детей, больных ангиной или ОРВИ, госпитализированных в то же отделение клиники и сопоставимых с основной группой по тяжести состояния. Другой задачей была оценка изменения показателей IFN-статуса у больных ИМ, не получавших в ходе лечения интерфероновых препаратов, через 1 месяц от начала заболевания. Проведенное исследование показало, что в остром периоде инфекционного мононуклеоза у больных в состоянии средней тяжести снижение способности лейкоцитов крови к вирус-индуцированной продукции IFN α и митоген-индуцированной продукции IFN γ встречается примерно с той же частотой, что и в контрольной группе детей, госпитализированных с ангиной или ОРВИ, или несколько реже. У больных ИМ было обнаружено, что в возрастной группе 3–6 лет способность клеток крови к продукции интерферонов на этой стадии заболевания практически не нарушена, а у пациентов 7–14 лет страдает почти исключительно альфа-интерферонез. В группе 7–14 лет I степень недостаточности продукции IFN α отмечалась в 38% случаев, а II степень — в 6%. Вероятно, именно эта группа больных нуждается в каких-либо вариантах заместительной терапии IFN α . Повторным обследованием после выписки из клиники было охвачено только 12 детей. Исходно частота и степень недостаточности интерферонеза в этой подгруппе не отличалась от показателей всей выборки пациентов, а через 1 месяц отмечалось некоторое увеличение потенциальных возможностей организма к продукции как IFN α , так и IFN γ даже без терапии препаратами, влияющими на интерфероновую систему.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, ВЭБ-инфекция у детей, IFN α , IFN γ , интерфероновый статус, интерферонотерапия.

Адрес для переписки:

Федорова Ирина Михайловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (903) 107-60-67. Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: vestnik-07@mail.ru

Contacts:

Irina M. Fedorova
125212 Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (903) 107-60-67. Fax: (495) 452-18-30.
E-mail: vestnik-07@mail.ru

Для цитирования:

Кукушкина Е.А., Котелева С.И., Бляхер М.С., Федорова И.М.,
Рамазанова З.К., Зверева Н.Н., Новосад Е.В., Самков А.А., Базарова М.В.
Изменение состояния интерфероновой защиты у детей, больных
инфекционным мононуклеозом, в динамике заболевания // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 157–164. doi: 10.15789/2220-7619-TIP-1349

Citation:

Kukushkina E.A., Koteleva S.I., Blyakher M.S., Fedorova I.M., Ramazanova Z.K.,
Zvereva N.N., Novosad E.V., Samkov A.A., Bazarova M.V. Altered interferon
defense in children with dynamically changed infectious mononucleosis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11,
no. 1, pp. 157–164. doi: 10.15789/2220-7619-TIP-1349

ALTERED INTERFERON DEFENSE IN CHILDREN WITH DYNAMICALLY CHANGED INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Kukushkina E.A.^a, Koteleva S.I.^a, Blyakher M.S.^a, Fedorova I.M.^a, Ramazanova Z.K.^a, Zvereva N.N.^b, Novosad E.V.^b, Samkov A.A.^c, Bazarova M.V.^c

^a G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^c Infectious Hospital No. 1 Moscow Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Abstract. The state of the interferon system in 38 children with acute infectious mononucleosis (IM) caused by the Epstein–Barr virus was analyzed. Interferon status was examined in accordance with F.I. Ershov method based on assessing related biological activity by measuring interferon level in the blood serum or produced by blood cells. The aim of the study was to gain scientifically justified data for use of interferon preparations or interferonogens in IM combination therapy. For this, interferon status in children with acute IM was compared with that one not only in control group (30 healthy children, aged 3–6 and 20 children, aged 7–14 years, examined earlier to create an intra-laboratory interferon normal range), but also in children with lacunar angina or acute respiratory viral infection, hospitalized in the same department of the clinic and comparable with the main group in severity of the condition. In addition, we assessed changes in IFN-status in IM patients receiving no interferon preparations, one month after the disease onset. The study showed that patients with moderate acute IM were featured with decreased potential of blood leukocytes to virus-induced IFN α and mitogen-induced IFN γ production observed with almost similar or some lower rate as in the control group of children hospitalized with angina or acute respiratory viral infection. Peripheral blood cells from moderate acute IM patients in the 3–6-year age group were found to produce virtually unaltered interferon level, whereas almost sole IFN-alpha production was affected in 7–14-year-old patients. Moreover, in 7–14-year old patients the level 1 and level 2 of IFN α deficiency was observed in 38% and 6% of cases, respectively. It is likely it was just this patient group requiring administration of any IFN α replacement therapy. As few as 12 children were re-examined after discharge from the clinic. Initially, prevalence and severity level of impaired interferon production in this subgroup did not differ from that one for total patient sample, whereas 1 month later a host potential to produce both IFN α and IFN γ even without therapy acting on interferon system was noted to be moderately augmented.

Key words: infectious mononucleosis, EBV infection in children, IFN α , IFN γ , interferon status, interferon therapy.

Введение

В настоящее время активно обсуждается вопрос о необходимости включения интерферонов или интерфероногенов в комплексную терапию инфекционного мононуклеоза (ИМ). Ранее, несмотря на важную роль интерфероновой системы в устойчивости к вирусу Эпштейна–Барр и дальнейшем удержании ВЭБ в латентном состоянии, интерфероновой терапии не придавалось такого большого значения, как при вирусных гепатитах или HIV-инфекции. Она проводилась при хронической активной ВЭБ-инфекции, лимфопролиферативных осложнениях/заболеваниях [21]; для лечения таких состояний она проводят и сейчас [20].

В российской научной литературе имеется довольно много публикаций, в которых показано, что применение интерферона альфа-2b в комплексной терапии инфекционного мононуклеоза способствует более быстрому выздоровлению пациентов [6, 11, 12]. Включение в терапию в остром периоде ИМ препаратов интерферона альфа-2b и меглюмина акридон-ацетата приводит к уменьшению выраженности и длительности симптомов интоксикации, температурной реакции, гепато- и спленомегалии,

лимфопролиферативного синдрома. В случаях, когда у больных развиваются нарушения в системе гемостаза, применение интерферона альфа-2b не только способствует более быстрой положительной динамике симптомов заболевания, но и ускоряет нормализацию показателей гемостаза [10].

В то же время анализ состояния самой интерфероновой системы во многих из подобных работ не проводится. Данные о резком снижении показателей интерферонового статуса при ИМ приводятся лишь в некоторых исследованиях [1, 3, 9].

Цель данной работы — исследовать лабораторные показания для применения интерферонов и интерфероногенов в комплексной терапии ИМ.

В задачи нашего исследования входило сравнение показателей интерферонового статуса у детей в остром периоде ИМ не только с показателями здоровых детей, но и с показателями у госпитализированных в то же отделение клиники больных ангиной или ОРВИ, сопоставимых с основной группой по тяжести состояния. Другой задачей была оценка изменения показателей IFN-статуса у больных ИМ, не получавших в ходе лечения интерфероновых препаратов, через 1 месяц от начала заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 22 ребенка 3–6 лет и 16 детей 7–14 лет, госпитализированных в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Москвы с диагнозом «ИМ, среднетяжелая форма». Диагноз верифицирован серологически. 12 пациентов были обследованы двукратно: на 5–7 день заболевания и через 1 месяц.

В контрольную группу вошли 9 детей, госпитализированных в то же отделение клиники с диагнозами «ангина» или «ОРВИ», имевших схожие клинические симптомы и сравнимые по тяжести состояния с исследуемой группой.

Исследование получило одобрение Комитета по этике ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 48 от 29 марта 2019 г.). Первое взятие крови проводилось при поступлении в клинику одновременно с другими пробами крови, необходимыми для диагностики состояния пациента; на повторное обследование дети были приведены родителями.

Показатели интерферонового статуса пациентов сравнивали с полученными ранее внутрилабораторными нормами: результатами обследования 30 здоровых детей 3–6 лет и 20 здоровых детей 7–14 лет.

Исследование интерферонового статуса выполнено по методике Ф.И. Ершова [5]. Методика предполагает оценку количества интерферона (выражается величиной 1/титр), находящегося в сыворотке крови или продуцируемого клетками крови по его биологической активности, то есть по способности биологических жидкостей осуществлять противовирусную защиту тестовой культуры фибробластов. Заключение о состоянии системы интерфероногенеза дается по 4 показателям: общее количество интерферона в сыворотке крови, спонтанная продукция интерферона, индуцированная продукция $IFN\alpha$, индуцированная продукция $IFN\gamma$.

Серологическая верификация диагноза «острый ИМ» проведена на ИФА-тест-системах ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) по наличию антител к EA- (IgG) и VCA- (IgG и IgM) антигенам вируса Эпштейна–Барр и отсутствию антител к EBNA, а также с учетом выявленной низкой avidности IgG-антител к VCA-антигену.

Статистическая обработка проведена с использованием программ MS Excel и StatSoft Statistica 6.0

Результаты и обсуждение

Проведенное лабораторное обследование показало, что в остром периоде (5–7 сутки) инфекционного мононуклеоза в сыворотке больных уровень интерферонов повышен. Его

Таблица 1. Способность клеток крови продуцировать интерфероны (среднее геометрическое и 95% доверительный интервал) у пациентов 3–6 лет в остром периоде ИМ и здоровых детей того же возраста

Table 1. Ability of blood cells to produce interferons (geometric mean and 95% confidence interval) in 3–6 years old patients in acute period of IM and in healthy children of the same age

		Дети с ИМ Children with IM n = 22	Здоровые дети Healthy children n = 30
Спонтанная продукция IFN, Ед/мл Spontaneous production of IFN, U/ml		1,1 (1,0–1,2)	1,2 (0,4–3,6)
Индукцированная продукция, Ед/мл Induced production, U/ml	IFNα	257 (223–295)	213 (191–240)
	IFNγ	43 (38–50)	37 (34–41)

активность составляет 6,5 Ед/мл, что статистически значимо отличается от показателя здоровых детей (2,3 Ед/мл, $p = 0,0001$) и от показателей контрольной группы больных ангиной или ОРВИ (2,5 Ед/мл, $p = 0,02$).

Спонтанная продукция интерферона, наблюдаемая в культурах клеток крови больных ИМ, невелика и не отличается от таковой в контрольных группах (табл. 1 и 2).

Способность клеток крови продуцировать $IFN\gamma$ у обследованных больных не ниже чем в норме, а показатели индуцированной продукции $IFN\alpha$ несколько снижены по сравнению с возрастной нормой только в группе пациентов 7–14 лет (табл. 2).

В ходе текущей работы для оценки состояния интерфероногенеза у конкретного пациента и необходимости дополнения его терапии интерферонами или интерферонгенами сравнение показателей индуцированной продукции $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ проводилось с наименьшим титром интерферона, наблюдаемым в группе здоровых детей. Для $IFN\alpha$ она составляла 80 Ед/мл в возрастной группе 3–6 лет и 160 Ед/мл в группе 7–12 лет, а для $IFN\gamma$ — 16 Ед/мл (одинаково для детей всех возрастов).

Для дальнейшего анализа мы воспользовались опытом авторов научных работ, обосновывающих применение интерфероновой терапии при инфекционных заболеваниях [5, 7], которые расценивают показатели интерферонового статуса, находящиеся на 1 титр ниже нормы,

Таблица 2. Способность клеток крови продуцировать интерфероны (среднее геометрическое и 95% доверительный интервал) у пациентов 7–14 лет в остром периоде ИМ и здоровых детей того же возраста

Table 2. Ability of blood cells to produce interferons (geometric mean and 95% confidence interval) in patients 7–14 years in acute period of infectious mononucleosis and in healthy children of the same age

		Дети с ИМ Children with IM n = 16	Здоровые дети Healthy children n = 20
Спонтанная продукция IFN, Ед/мл Spontaneous production of IFN, U/ml		1,1 (1,1–1,2)	1,2 (1,1–1,4)
Индукцированная продукция, Ед/мл Induced production, U/ml	IFNα	218 (179–261)	257 (229–288)
	IFNγ	47 (40–57)	46 (40–54)

как I степень недостаточности интерфероногенеза, а более низкие — как II или III степень.

В соответствии с этими критериями I степень недостаточности продукции IFN α в остром периоде ИМ в группе пациентов 3–6 лет, обследованных нами, была у 1 ребенка (4,5%), II степень — еще у одного. Для продукции IFN γ I степень недостаточности отмечалась у 2 (9,1%) детей, а II степень — у 1 ребенка (4,5%), причем сочетанное снижение как α - так и γ -интерфероногенеза имело место только у 1 ребенка.

В группе пациентов 7–14 лет I степень недостаточности продукции IFN α была у 6 (37,5%) детей, а II степень — у одного (6,3%). Снижение продукции IFN γ происходило в остром периоде заболевания у 1 ребенка (6,3%) детей.

Далее среди больных ИМ, здоровых детей и детей контрольной группы, больных ангиной или ОРВИ, мы оценили процент детей с I и II степенью недостаточности в системе интерфероногенеза (табл. 3).

Эти данные показывают, что в остром периоде инфекционного мононуклеоза у больных в состоянии средней тяжести снижение способности лейкоцитов крови к вирус-индуцированной продукции IFN α и митоген-индуцированной продукции IFN γ встречается примерно с той же частотой или несколько реже, чем в контрольной группе детей с диагнозами «ангина» или «ОРВИ».

Изменение показателей интерферонового статуса в динамике заболевания было прослежено нами у 12 человек из 38. Только двое из них получали терапию рекомбинантным IFN α -2b (их показатели не включены в табл. 4), остальные находились на симптоматической терапии. Исходно в этой группе индуцированная продукция IFN α была в норме у всех, кроме 1 пациентки с недостаточностью II степени по этому параметру. Недостаточность продукции IFN γ I и II степени отмечена еще у двоих детей.

В таблице 4 можно видеть небольшое снижение уровня интерферона в плазме крови больных через 1 месяц после лечения в стационаре и некоторое увеличение среднего титра индуцированной продукции IFN γ . Этот показатель нормализовался у двоих детей после снижения в остром периоде ИМ и еще у двоих повысился в пределах нормального диапазона.

Таблица 3. Количество детей с низкими показателями индуцированной продукции IFN α и IFN γ в остром периоде ИМ в сравнении с показателями контрольных групп

Table 3. Number of children with low rates IFN α and IFN γ produced by activated peripheral blood cells in acute period of IM in comparison with control groups

		% лиц с недостаточностью продукции % of persons with insufficient production				
		IFN α		IFN γ		одновременно IFN α и IFN γ both IFN α and IFN γ
		I степени I degree	II–III степени II–III degrees	I степени I degree	II–III степени II–III degrees	
Острый период ИМ Acute period of IM	n = 38	7 (18,4%)	2 (5,2%)	3 (7,9%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)
Лакунарная ангина или ОРВИ Lacunar angina or acute respiratory viral infection	n = 9	1 (11,1%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)
Здоровые дети Healthy children	n = 50	5 (10,0%)	0	6 (12,0%)	0%	1 (2,0%)

Способность лейкоцитов к продукции $IFN\alpha$ не изменилась по сравнению с исходной у 11 детей, а у пациентки с исходным снижением этого параметра вошла в пределы нормы. Хотя группа слишком мала и наблюдаемые изменения статистически недостоверны, хотелось бы все же отметить, что, как и в остром периоде, в периоде реконвалесценции ИМ не наблюдается значительного снижения способности лейкоцитов и лимфоцитов к продукции интерферонов.

Наши данные показывают, что снижение продукции интерферонов нехарактерно для ИМ. Недостаточность индуцированной продукции $IFN\gamma$ в остром периоде ИМ наблюдается менее чем у четверти пациентов, а недостаточность индуцированной продукции $IFN\alpha$ развивается чаще, особенно у детей 7–14 лет, но ее встречаемость, по нашим наблюдениям, тоже не превышает 50%.

Если учесть, что величина индуцированной продукции интерферонов *in vitro*, отражает не покрытие текущих потребностей организма, а его потенциальные возможности продуцировать интерферон при возникновении необходимости в дополнительной противoinфекционной защите, то можно отметить, что даже в остром периоде ИМ уровень функционирования интерфероновой системы достаточно высок, и необходимость в применении заместительной интерферонотерапии по лабораторным данным отсутствует. Степень снижения показателей в тех случаях, когда по нашим данным она имеет место, также невелика: на 1–2 титра. Можно предположить, что при длительном сохранении такой ситуации (несколько месяцев) даже небольшая степень дефицита создает низкую защищенность ребенка от вирусных инфекций (как это происходит у детей, часто и длительно болеющих ОРВИ [8]), но при ИМ это не так.

Наши собственные данные недостаточны для того, чтобы статистически оценить изменение показателей интерфероновой статус в периоде реконвалесценции ИМ. Данные табл. 4 показывают, что через 1 месяц после лечения в клинике эти показатели не снизились, и не более того. Однако в статье Тимченко В.Н. и соавт. [9] после лечения проанализировано изменение спонтанной и индуцированной продукции $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ у 50 детей дошкольного возраста, больных ИМ. Половина из них дополнительно к базисной терапии получала препарат рекомбинантного $IFN\alpha$ -2b «Виферон». В остром периоде авторы, как и мы, не выявили различий между изучаемыми показателями у больных ИМ и у здоровых детей. В периоде реконвалесценции ими зарегистрировано повышение продукции $IFN\alpha$ при обоих вариантах лечения, а продукция $IFN\gamma$ в группе, не получавшей «Виферон», была снижена как по сравнению с показателями второй группы, так и здоровых детей.

Возможно, изменения в способности лейкоцитов и лимфоцитов крови продуцировать $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ в периоде реконвалесценции зависят от состояния этого показателя в остром периоде ИМ. В дальнейшем мы планируем подробнее изучить этот вопрос.

Во всяком случае, возможности интерфероновой системы у больных инфекционным мононуклеозом позволяют им не только активно реагировать на ВЭБ-инфекцию (о чем свидетельствуют активность интерферона в сыворотке крови и интерферона, продуцируемого в культуре спонтанно), но и сохраняют потенциал продуцировать $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ дополнительно, что важно в плане защиты от присоединения других инфекций.

По литературным данным, при ВЭБ-инфекции наибольшая активация интерфероновой

Таблица 4. Показатели интерфероновой статус (среднее геометрическое и 95% доверительный интервал) в группе детей, больных ИМ, до и после лечения

Table 4. Ability of blood cells to produce interferons (geometric mean and 95% confidence interval) children with IM before and after treatment

	Средние значения показателей Average values of indicators	
	на 5–7 сутки ИМ on 5–7 days of illness	через 1 месяц in a 1 month
Активность IFN в плазме, Ед/мл IFN in plasma, U/ml	7,2 (6,5–8,2)	6,2 (4,9–7,8)
Спонтанная продукция IFN , Ед/мл Spontaneous production of IFN, U/ml	1,2 (1,1–1,3)	1,2 (1,1–1,3)
Индуцированная продукция, Ед/мл Induced production, U/ml	$IFN\alpha$	218 (178–273)
	$IFN\gamma$	46 (38–56)
		269 (223–324)
		64 (51–79)

системы происходит на ранних этапах как результат комплекса реакций врожденного иммунитета. $IFN\alpha$ играет значительную роль в формировании антивирусного состояния клетки и вместе с $IFN\gamma$ и другими провоспалительными цитокинами обеспечивает взаимодействие плазмоцитодендритных клеток, макрофагов, НК-клеток и формирующихся антигенспецифических Т-клеток, приводящее к ограничению пролиферации ВЭБ-трансформированных В-клеток и переходу ВЭБ в латентное состояние. В результате этого взаимодействия инфекция часто протекает бессимптомно [13, 14, 15, 16].

ИМ развивается, когда ВЭБ-инфекция переходит из латентного в литический цикл. При этом также значительна роль $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, особенно $IFN\gamma$, который продуцируется клеточными элементами как врожденного, так и адаптивного иммунитета [13, 17], но ведущую роль в ограничении инфекции играют НК-клетки [13, 16]. Масштабы иммуноопосредованного воспаления на данном этапе настолько велики, что введение экзогенного $IFN\alpha$ могло бы оказывать положительное влияние за счет противовирусного действия, а также преимущественного повышения функциональной активности НК-клеток, а не вирус-специфических Т-клеток, как это показано для других персистирующих инфекций [18, 19].

К сожалению, в большинстве статей, сообщающих о значительном клиническом эффекте интерфероновых препаратов или интерферогенов при инфекционном мононуклеозе, анализ состояния интерфероновой системы не приводится. Подход к количественной оценке недостаточности интерфероновой системы и количественной оценке эффекта терапии более разработан для такой категории пациентов, как «часто и длительно болеющие дети». Показано, что дифференцированное назначение интерфероновой или интерферогенной терапии с учетом показателей интерферонового статуса больного эффективно при ОРВИ [4, 7].

При инфекционном мононуклеозе по данным Боковой А.Г. и Домрачевой М.Е. [1], заметная доля детей, в том числе в остром периоде, нечувствительна к терапии иммуноотропными

препаратами. В то же время у чувствительных к этому виду лечения пациентов действительно наблюдается хороший клинический эффект, причем этот эффект зависит от тяжести состояния больного ИМ и от дозы препарата интерферона [3].

Имеются сведения, что влиянию интерферонотерапии на собственно интерфероновый статус человека не всегда можно дать однозначно положительную оценку. По данным Кузнецова С.И. и соавт. [2], непосредственно по окончании курса терапии больных с герпесвирусной инфекцией индуцированная продукция $IFN\alpha/\beta$ их лейкоцитами снижалась и восстанавливалась только в отдаленные сроки (2–5 месяцев).

Таким образом, применение интерфероновой терапии, вероятно, не является безусловно показанным всем пациентам с ИМ, по крайней мере в состоянии средней тяжести, и иммунокорректирующая терапия должна назначаться с учетом состояния иммунной системы пациента. В продолжение данной работы нами планируется обследование более обширных групп больных с целью уточнения состояния интерфероновой системы в периоде реконвалесценции ИМ и определения стадии заболевания, на которой снижение показателей интерфероногенеза наиболее выражено.

Заключение

1. В обследованной нами группе из 38 детей с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, среднетяжелая форма» заместительная интерфероновая терапия, вероятно, была бы наиболее эффективной у тех 44% больных, у которых при поступлении в клинику регистрировалась недостаточность интерфероновой защиты I–II степени.

2. Определение стадии заболевания, на которой чаще всего наблюдается снижение функционального потенциала интерфероновой системы, и оценка результатов разных вариантов лечения может дать лабораторное обоснование заместительной терапии препаратами $IFN\alpha-2b$ при инфекционном мононуклеозе.

Список литературы/References

1. Боковой А.Г., Домрачева М.Е. Клиническое значение иммунологических показателей при инфекционном мононуклеозе у детей // Детские инфекции. 2006. № 3. С. 18–22. [Bokovoy A.G., Domracheva M.E. Clinical value of immunological factors in infectious mononucleosis in children. *Detskije Infektsii = Children's Infections*, 2006, no. 3, pp. 18–22. (In Russ.)]
2. Кузнецов С.И., Смирнов Н.А., Латаш В.Г., Ариненко Р.Ю., Аникин В.Б., Носикова Е.В. Влияние интерферонотерапии на интерфероновый статус больных и функциональную активность некоторых клеточных популяций крови // Медицинская иммунология. 2003. Т. 5, № 1–2. С. 73–80. [Kuznetsov S.I., Smirnov N.A., Latash V.G., Arinenko R.Y., Anikin V.B., Nosikova E.V. Influence of interferon treatment on patients interferon status and functional activity of some blood cell populations. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, vol. 5, no. 1–2, pp. 73–80. (In Russ.)]

3. Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Шмидт А.Р. Клеточная чувствительность к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 79–84. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Schmidt A.R. In vitro cellular response to interferon- $\alpha 2$ in children with infectious mononucleosis caused by Epstein–Barr virus. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 79–84. (In Russ.)]
4. Образцова Е.В., Осидак Л.В., Головачева Е.Г. Препараты интерферона и его индукторов при гриппе и ОРИ у детей // Детские инфекции. 2010. № 1. С. 35–40. [Obraztsova E.V., Osidak L.V., Golovacheva E.G. Interferons and its inducers in treatment of influenza and acute respiratory infection in children. *Detskie Infektsii = Children's Infections*, 2010, no. 1, pp. 35–40. (In Russ.)]
5. Определение интерферонов статуса как показателя неспецифической резистентности организма человека: практические рекомендации Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»; под ред. Ф.И. Ершова. М., 2018. 26 с. [Determination of interferon status as an indicator of non-specific resistance of the human body. Practical recommendations of the Association of Laboratory and Organizations "Federation of Laboratory Medicine"; ed. by F.I. Ershov. Moscow, 2018. 26 p. (In Russ.)]
6. Попова О.А., Чуйкова К.И., Якимов В.Л., Минакова Ю.В., Петрова Е.И. Клинико-иммунологические показатели у детей с инфекционным мононуклеозом на фоне противовирусной терапии в острый период и в катанезе // Лечащий врач. 2016. № 11. С. 92–95. [Popova O.A., Chuiikova K.I., Yakimov V.L., Minakova Yu.V., Petrova E.I. Clinical and immunologic indices in children with infectious mononucleosis at the background of antiviral therapy in acute period and in catamnesis. *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2016, no. 11, pp. 92–95. (In Russ.)]
7. Савенкова М.С., Караштина О.В., Шабат М.Б., Красева Г.Н., Абрамова Н.А., Красева Т.Е. Интерфероновый статус и выбор индукторов интерферонов у часто болеющих детей // Детские инфекции. 2016. № 2. С. 45–51. [Savenkova M.S., Karashchina O.V., Shabat M.B., Kraseva G.N., Abramova N.A., Kraseva T.E. Interferon status and choice of interferons inducers in frequently ill children. *Detskie Infektsii = Children's Infections*, 2016, no. 2, pp. 45–51. (In Russ.)] doi: 10.22627/2072-8107-2016-15-2-45-51
8. Самсыгина Г.А., Трошина В.В., Перцева А.Д. Особенности механизмов врожденного и адаптивного иммунитета у часто болеющих детей // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2013. № 2. С. 42–46. [Samsygina G.A., Troshina V.V., Pertseva A.D. Special aspects of innate and adaptive immunity mechanisms in frequently ill children. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*. 2013, no. 2, pp. 42–46. (In Russ.)]
9. Тимченко В.Н., Баннова С.Л., Калинина Н.М., Булина О.В., Выжлова Е.Н., Назарова А.Н., Федорова А.В. Клиническая и иммунологическая эффективность рекомбинантного интерферона альфа-2b при остром Эпштейна–Барр вирусном мононуклеозе у детей дошкольного возраста // Детские инфекции. 2016. № 3. С. 30–37. [Timchenko V.N., Bannova S.L., Kalinina N.M., Bulina O.V., Vyzhlova E.N., Nazarova A.N., Fedorova A.V. Clinical and immunological efficacy of the recombinant interferon alfa-2b of acute Epstein–Barr viral mononucleosis in preschool children. *Detskie Infektsii = Children's Infections*, 2016, no. 3, pp. 30–37. (In Russ.)]
10. Хмилевская С.А., Зайцева И.А., Зрячкин Н.И., Бережнова И.А. Особенности состояния системы гемостаза и иммунопатологические реакции при Эпштейна–Барр вирусной инфекции у детей // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7, № 2. С. 75–82. [Khmilevskaya S.A., Zaitseva I.A., Zryachkin N.I., Berezhnova I.A. Features state of hemostasis and immunopathological reactions in Epstein–Barr virus infection in children. *Jurnal infekologii = Journal Infectology*, 2015, vol. 7, no. 2, pp. 75–82. (In Russ.)]
11. Хохлова З.А., Попова О.А., Чуйкова К.И., Якимов В.Л., Минакова Ю.В., Петрова Е.И. Инфекционный мононуклеоз у детей: особенности течения заболевания в зависимости от видов противовирусной терапии // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 3. С. 67–74. [Khokhlova Z.A., Popova O.A., Chuiikova K.I., Yakimov V.L., Minakova Yu.V., Petrova E.I. Infectious mononucleosis at children: features of the course of the disease depending on types of antiviral therapy. *Zhurnal infekologii = Journal of Infectology*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 67–74. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-3-67-74
12. Шведова Н.М., Михайлова Е.В., Цека Ю.С., Чудакова Т.К. Инфекционный мононуклеоз у детей: клинико-лабораторное обоснование и экономическая эффективность применения иммунокорректоров // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 3. С. 512–517. [Shvedova N.M., Mikhailova E.V., Tseka Y.S., Chudakova T.K. Infectious mononucleosis in children: clinical and laboratory rationale and economic efficiency of application of immunocorrectors. *Saratovskij nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2013, vol. 9, no. 3, pp. 512–517. (In Russ.)]
13. Azzi T., Lünemann A., Murer A., Ueda S., Béziat V., Malmberg K.J., Staubli G., Gysin C., Berger C., Chijioke O., Nadal D. Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood*. 2014, vol. 124, no. 16, pp. 2533–2543. doi: 10.1182/blood-2014-01-553024
14. Chijioke O., Azzi T., Nadal D., Munz C. Innate immune responses against Epstein–Barr virus infection. *J. Leucoc. Biol.*, 2013, vol. 94, no. 6, pp. 1185–1190. doi: 10.1189/jlb.0313173
15. Gujer C., Murer A., Muller A., Vanoaica D., Sutter K., Jacque E., Fournier N., Kalchschmidt J., Zbinden A., Capaul R., Dzvonek A., Mondon P., Dittmer U., Munz C. Plasmacytoid dendritic cells respond to Epstein–Barr virus infection with a distinct type I interferon subtype profile. *Blood Adv.*, 2019, vol. 3, no. 7, pp. 1129–1144. doi: 10.1182/bloodadvances.2018025536
16. Hislop A.D. Early virological and immunological events in Epstein–Barr virus infection. *Curr. Opin. Virol.*, 2015, vol. 15, pp. 75–79. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.002
17. Hoshino Y., Nishikawa K., Ito Y., Kuzushima K., Kimura H. Kinetics of Epstein–Barr virus load and virus-specific CD8⁺ T cells in acute infectious mononucleosis. *J. Clin. Virol.*, 2011, vol. 50, no. 3, pp. 244–246. doi: 10.1016/j.jcv.2010.11.017
18. Kwaa A.K.R., Talana C.A.G., Blankson J.N. Interferon alpha enhances NK cell function and the suppressive capacity of HIV-specific CD8⁺ T cells. *J. Virol.*, 2019, vol. 93, no. 3: e01541-18. doi: 10.1128/JVI.01541-18
19. Micco L., Peppia D., Loggi E., Schurich A., Jefferson L., Cursaro C., Panno A.M., Bernardi M., Brander C., Bihl F., Andreone P., Maini M.K. Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 225–233. doi: 10.1016/j.jhep.2012.09.029

20. Roliński J., Grywalska E., Pyzik A., Dzik M., Opoka-Winiarska V., Surdacka A., Maj M., Burdan F., Pirożyński M., Grabarczyk P., Starosławska E. Interferon alpha as antiviral therapy in chronic active Epstein–Barr virus disease with interstitial pneumonia—case report. *BMC Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 190. doi: 10.1186/s12879-018-3097-6
21. Wilson W.H., Kingma D.W., Raffel M., Wittes R.E., Jaffe E.S. Association of lymphomatoid granulomatosis with Epstein–Barr viral infection of B lymphocytes and response to interferon-alpha 2b. *Blood*, 1996, vol. 87, no. 11, pp. 4531–4537.

Авторы:

Кукушкина Е.А., младший научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Котелева С.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Бляхер М.С., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Федорова И.М., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Рамазанова З.К., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Зверева Н.Н., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней у детей ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Новосад Е.В., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней у детей ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Самков А.А., врач-инфекционист, педиатр, зав. 13 детским отделением ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;

Базарова М.В., эпидемиолог, заместитель главного врача ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия.

Authors:

Kukushkina E.A., Junior Researcher, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Koteleva S.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Blyakher M.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Fedorova I.M., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Ramazanova Z.K., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zvereva N.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases in Children, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Novosad E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases in Children, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Samkov A.A., Infectious Disease Physician, Pediatrician, Head of the Department No. 13, Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russian Federation;

Bazarova M.V., Epidemiologist, Deputy Chief Physician, Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russian Federation.

НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ УРОВНЕ ИММУННОЙ ПРОСЛОЙКИ НАСЕЛЕНИЯ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ЛИХОРАДКИ КУ

Е.В. Найденова¹, С. Каливоги², М.Ю. Карташов³, А.В. Бойко¹, С. Бумбали²,
В.А. Сафронов¹, К.С. Захаров¹, А. Нассер², Ф. Дrame², О.К. Константинов²,
Н'Ф. Магассуба⁴, М.Й. Буаро², С.А. Щербакова¹, В.В. Кутырев¹

¹ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия

² Исследовательский институт прикладной биологии, г. Киндия, Гвинейская Республика

³ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Университет им. Гамаль Абдель Насера, Конакри, Гвинейская Республика

Резюме. Коксиеллез (лихорадка Ку) — общее для человека и животных природно-очаговое заболевание, возбудителем которого являются бактерии вида *Coxiella burnetii*. Один из факторов, показывающих возможность циркуляции патогена на определенной территории — наличие иммунной прослойки у жителей региона. Изучение иммунной структуры населения Гвинейской Республики в отношении коксиеллезов началось в 80-е годы прошлого столетия. Настоящее исследование проводилось в 2015–2019 гг. с целью получения новых сведений об уровне иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к возбудителю лихорадки Ку и сравнения с результатами исследований, проведенных ранее. Специфические антитела класса IgG в крови жителей Гвинеи выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Россия). Сыворотки исследовали в разведении 1:100. Антитела к *C. burnetii* были обнаружены в 124 (5,3% [ДИ 4,5–6,3]) образцах из 2346. Проведенное исследование подтверждает полученные ранее данные о циркуляции возбудителя коксиеллеза во всех ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики. Природно-климатические условия региона, разнообразие обитающих на данной территории видов иксодовых клещей, являющихся резервуарами и переносчиками инфекции, а также большое количество сельскохозяйственных животных, находящихся в личной собственности населения, являются факторами для активной циркуляции возбудителя лихорадки Ку и возникновению вспышек вызываемого им заболевания. Полученные результаты показывают необходимость дальнейшего изучения распространения *C. burnetii* на территории Гвинейской Республики. Учитывая эпидемиологическую значимость лихорадки Ку, актуальной задачей остается изучение вопроса о доле данной инфекционной болезни в общей структуре заболеваний, регистрируемых на территории Республики Гвинея. Также необходимо проведение регулярного эпизоотологического мониторинга территории с целью уточнения видов носителей и переносчиков *C. burnetii* в разных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики и изучение уровня иммунитета к возбудителю лихорадки Ку у крупного и мелкого рогатого скота, являющегося основным источником заражения людей. Полученные сведения позволят определить наличие природного очага данной инфекции и его границы, а также разработать комплекс профилактических (противоэпидемических) мероприятий.

Ключевые слова: *Coxiella burnetii*, лихорадка Ку, Гвинейская Республика, антитела класса G, иммуноферментный анализ, иммунная прослойка.

Адрес для переписки:

Найденова Екатерина Владимировна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб».
Тел.: 8 (996) 203-37-97. E-mail: katim2003@mail.ru

Contacts:

Ekaterina V. Naidenova
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone: +7 (996) 203-37-97. E-mail: katim2003@mail.ru

Для цитирования:

Найденова Е.В., Каливоги С., Карташов М.Ю., Бойко А.В., Бумбали С.,
Сафронов В.А., Захаров К.С., Нассер А., Дrame Ф., Константинов О.К.,
Магассуба Н'Ф., Буаро М.Й., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Новые
данные об уровне иммунной прослойки населения Гвинейской
Республики к возбудителю Лихорадки Ку // Инфекция и иммунитет.
2021. Т. 11, № 1. С. 165–170. doi: 10.15789/2220-7619-NDO-1485

Citation:

Naidenova E.V., Kalivogui S., Kartashov M.Yu., Boyko A.V., Boubaly S.,
Safronov V.A., Zakharov K.S., Nassour A.A., Drame F., Konstantinov O.K.,
Magassouba N'F., Boiro M.Y., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V. New data on the
level of immune stratum against Q fever agent in population of the Republic
of Guinea // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2021, vol. 11, no. 1, pp. 165–170. doi: 10.15789/2220-7619-NDO-1485

NEW DATA ON THE LEVEL OF IMMUNE STRATUM AGAINST Q FEVER AGENT IN POPULATION OF THE OF REPUBLIC OF GUINEA

Naidenova E.V.^a, Kalivogui S.^b, Kartashov M.Yu.^c, Boyko A.V.^a, Boumbaly S.^b, Safronov V.A.^a, Zakharov K.S.^a, Nassour A.A.^b, Drame F.^b, Konstantinov O.K.^b, Magassouba N'F.^d, Boiro M.Y.^b, Scherbakova S.A.^a, Kuttyrev V.V.^a

^a Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

^b Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea

^c State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russian Federation

^d Gamal Abdel Naser University, Conakry, Republic of Guinea

Abstract. Coxiellosis (Q fever) is a natural focal disease common to humans and animals, the causative agent of which is bacteria of the species *Coxiella burnetii*. One of the factors showing the possibility of pathogen circulation in a certain territory is assessed by the presence of an immune stratum in the inhabitants of the region. In the 1980s, the study of the immune structure of the population of the Republic of Guinea in relation to coxiellosis has begun. The present study, carried out in 2015–2019, has been aimed to obtain new information about the immune stratum of the population of the Republic of Guinea against the causative agent of Q fever and to compare it with previous studies. Specific IgG antibodies in the blood of the Guinea residents were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a set of reagents manufactured at the St. Petersburg Pasteur Institute (St. Petersburg, Russian Federation). The serum samples were tested in at 1:100 dilution. Antibodies against *C. burnetii* were detected in 124/2346 (5.3% [CI 4.5–6.3]) samples. This study confirms the previously obtained data on the circulation of the causative agent of coxiellosis in all landscape and geographical zones of the Republic of Guinea. The natural and climatic conditions of the region, the variety of ixodic tick species currently inhabiting this territory being a reservoir and vector of infection, as well as a large amount of livestock are the factors for active circulation of the Q fever pathogen and the emergence of related disease outbreaks. The data obtained necessitate continuing further studies on distribution of *C. burnetii* in the territory of the Republic of Guinea. Taking into consideration the epidemiological significance of Q fever, a pressing task is to study a proportion of this infectious disease in the overall structure of diseases registered in the territory of the Republic of Guinea. It is also necessary to conduct regular epizootological monitoring in order to clarify the types of carriers and vectors of *C. burnetii* in different landscape and geographical zones of the Republic of Guinea as well as to assess the immune stratum against the pathogen in large and small cattle being the main sources of infection for humans. The data obtained will allow us to determine presence of a natural focus of this infection as well as its borders and develop a set of preventive (anti-epidemic) measures.

Key words: *Coxiella burnetii*, Q fever, Republic of Guinea, IgG class antibodies, ELISA, immune stratum.

Введение

Коксиеллез (лихорадка Ку) — общее для человека и животных природно-очаговое заболевание, возбудителем которого являются бактерии вида *Coxiella burnetii*. Заболевание у людей протекает в виде лихорадки с общетоксическими симптомами с возможным переходом в хроническую форму. В природных очагах резервуаром возбудителя являются иксодовые и аргасовые клещи, дикие мелкие млекопитающие, среди сельскохозяйственных животных — мелкий и крупный рогатый скот. В связи с широким распространением инфекции, многообразием путей передачи (контактный, пищевой, воздушно-пылевой) лихорадка Ку представляет важную медико-социальную проблему во всем мире [1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11].

Современные данные о заболеваемости лихорадкой Ку и распространении *C. burnetii* на территории Африки являются ограниченными и неоднородными [3, 6, 9, 10, 11, 12].

Гвинейская Республика расположена в западной части африканского континента. По данным, полученным в конце мая 2020 г., в стране проживают 14,3 млн человек [12]. Территория государства условно разделена на 4 ландшафтно-географические зоны (рис.). Нижняя Гвинея расположена на западе страны и представляет

собой плоскую низменность шириной 32 км, с высотами менее 150 м над уровнем моря. Это район товарно-экспортного земледелия. На территории другой ландшафтно-географической зоны — Средней Гвинеи — расположен песчанниковый массив Фута-Джаллон с вершинами 1200–1400 м, который пересекает страну с севера на юг. Основное занятие населения — скотоводство. К востоку от массива Фута-Джаллон, на равнинах в бассейне верхнего течения реки Нигер, находится Верхняя Гвинея. Это район саванн, заселенный преимущественно земледельцами. Лесная Гвинея расположена на юго-востоке страны, в этом регионе большинство ландшафтов составляют саванны, но в долинах рек сохранились тропические леса. Население состоит из отдельных народов, занимающихся в большинстве своем земледелием [8].

Попытки изучения иммунной прослойки жителей Гвинейской Республики к коксиеллезам были предприняты в 80-е гг. XX в. В этот период на базе Советско-Гвинейской научно-исследовательской вирусологической и микробиологической лаборатории проведена работа по определению иммунной структуры населения отдельных районов Гвинеи с целью выявления риккетсиозов на данной территории. Были изучены сыворотки крови людей, собранные во всех четырех ландшафтно-географических

районах. Полученные образцы анализировали с использованием реакции связывания комплемента (РСК) с антигеном *S. burnetii*. В результате работы впервые на территории Гвинейской Республики установлена циркуляция возбудителя лихорадки Ку, причем наиболее высокая доля иммунной прослойки населения был выявлен в Лесной Гвинее [1]. Однако в последующие годы, в связи с отсутствием достаточного финансирования, работа по изучению распространения возбудителя на данной территории была прервана, а значимость этой инфекционной болезни в общей структуре заболеваемости Гвинеи так и не определена.

В настоящее время, при выполнении совместных НИР в рамках Российско-Гвинейского научно-технического сотрудничества в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций, исследования в этом направлении были продолжены [3].

Целью данной работы являлось изучение уровня иммунной прослойки населения различных ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики к возбудителю лихорадки Ку методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы

Исследования проводили на базе лаборатории Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, расположенного на территории Исследовательского института прикладной биологии, г. Киндиа, Гвинейская Республика [4].

Образцы крови практически здоровых людей, проживающих на территории Гвинеи, были получены с мая 2015 по октябрь 2019 гг. Кровь забирали в количестве 5 мл из локтевой вены натощак по общепринятой методике с использованием системы для забора крови. В связи с тем, что на территории данного государства в 2013–2016 гг. была зарегистрирована эпидемия болезни, вызванной вирусом Эбола, собранные сыворотки крови тестировали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) при помощи набора реагентов «АмплиСенс EBOV Zaire-FL» (ООО «Интерлабсервис», Россия) с целью исключения вероятности выявления вирусной РНК и обеспечения биологической безопасности при работе с материалом [2]. Во всех случаях результат был отрицательный. Гвинейская Республика является также территорией, эндемичной по малярии, поэтому для исключения неспецифических результатов полученные образцы были исследованы методом иммунохроматографического анализа (ИХА) с наборами реагентов SDBIOLINE Malaria Ag P.f./Pan (Standart Diagnostics, Inc., Корея). Пробы крови, содержащие антигены возбудителей малярии, в последующее исследование не вошли.

Всего было отобрано 2346 сывороток крови людей, проживающих во всех 4 ландшафтно-географических зонах Гвинеи. В работу включены представители возрастных групп от 1 до 90 лет, из которых 1194 (49,5%) — женщины, а 1152 (50,5%) — мужчины.

Работу проводили методом ИФА с использованием набора реагентов «Тест-система имму-

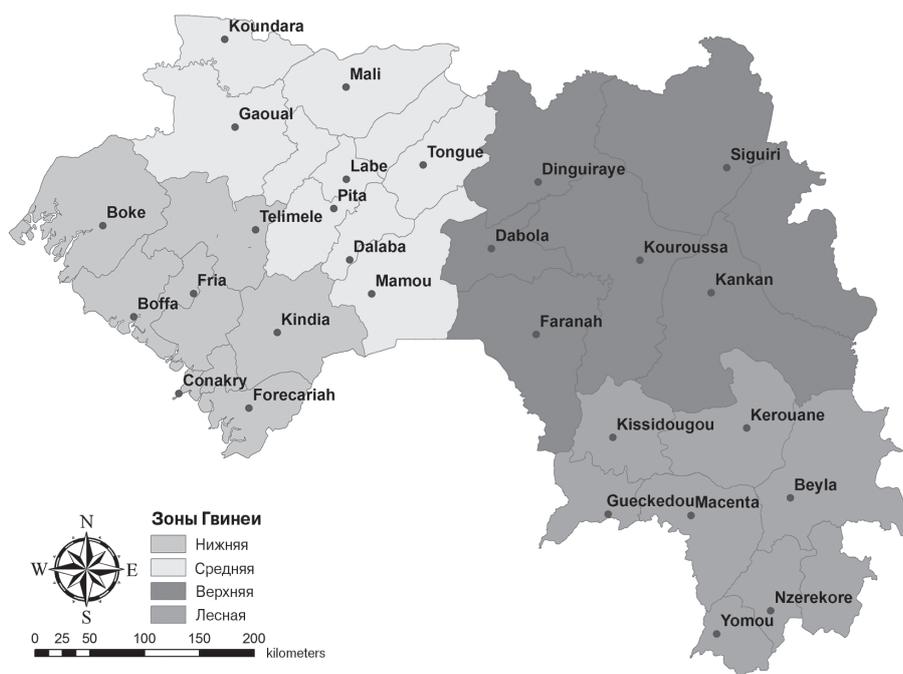


Рисунок. Ландшафтно-географические зоны Гвинеи

Figure. Landscape-geographic zones of Guinea

ноферментная для выявления антител класса G к антигенам *S. burnetii*» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия) в соответствии с инструкцией, прилагаемой к препарату. Сыворотки исследовали в разведении 1:100.

Статистическую обработку материала осуществляли по методу Уилсона, для чего рассчитывали долю серопозитивных образцов в каждой выборке и 95%-ные доверительные интервалы (ДИ) для долей иммунной прослойки.

Результаты и обсуждение

При исследовании сывороток крови людей, проживающих в различных зонах Гвинейской Республики, в период 2015–2019 гг. антитела к возбудителю лихорадки Ку, относящиеся к классу IgG, выявлены во всех возрастных группах, при этом зависимости уровня иммунной прослойки от половой принадлежности обследованных лиц не наблюдалось. В целом по стране специфические иммуноглобулины к *S. burnetii* были зарегистрированы в 124 из 2346 сыворотках крови, что составило 5,3%.

При сравнении данных, полученных в последние годы, с результатами исследований, проведенных в 80-е гг. прошлого столетия, существенно увеличилось количество жителей Гвинейской Республики, имеющих в крови антитела к возбудителю лихорадки Ку. Данный показатель вырос в 2,5 раза (табл.). Тем не менее отмечают разнонаправленные изменения в количестве серопозитивных лиц в условиях разных ландшафтно-географических зон. Так, в табл. видно, что повышение уровня иммунной прослойки населения к *S. burnetii* произошло главным образом за счет Нижней Гвинеи. На территории Средней Гвинеи рост был срав-

нительно меньше (в 1,7 раза). Однако имеющаяся трансгрессия ДИ не позволяет говорить о статистической значимости роста.

На территории Верхней и Лесной Гвинеи отмечается незначительное снижение уровня иммунной прослойки среди населения к возбудителю лихорадки Ку, свидетельством чего является наличие выраженной трансгрессии ДИ уровней иммунной прослойки. Так, в Лесной Гвинее зарегистрировано снижение доли иммунной прослойки в 1,5 раза, а на территории Верхней Гвинеи уровень роста не является значимым.

Анализ уровней иммунной прослойки в различных ландшафтно-географических зонах показал ее неравномерность как в прошлом, так и в 2015–2019 гг. В частности, в 80-х гг. XX в. наибольшая доля серопозитивных лиц регистрировалась в Лесной Гвинее (8,7%), в то время как на территории Нижней Гвинеи доля положительных проб была наименьшей (0,9%) (табл.).

В настоящее время большая часть положительных результатов на наличие специфических антител к возбудителю выявлена на территории Нижней Гвинеи (6,2%), а меньшая — на территории Средней Гвинеи (3,3%). Следует отметить, что наиболее частое выявление IgG к *S. burnetii* в сыворотках крови жителей Нижней Гвинеи (6,2%), по сравнению с показателями Средней (3,3%) и Верхней Гвинеи (4,96%), статистически незначимо (табл.).

Причиной отмеченных изменений мог стать процесс урбанизации, который привел к росту численности населения столицы Гвинеи — г. Конакри более чем в 2 раза, начиная с 90-х гг. прошлого столетия. Активное перемещение жителей из деревень в город на фоне увеличения транспортной доступности создало условия для перераспределения иммунных лиц в пользу крупных населенных пунктов, расположенных

Таблица. Выявление антител к возбудителю лихорадки Ку в сыворотках крови жителей Гвинеи в разные годы исследований

Table. Detection of serum antibodies against the causative agent of Q fever in the Guinea residents assessed in various research timepoints

Ландшафтно-географические зоны Landscape and geographical zones	Время проведения исследований/The duration of the study			
	80-е гг. XX в. 80 th years of the XX century*		2015–2019 гг. 2015–2019	
	Количество исследованных образцов Sample size	Количество положительных; % положительных; (ДИ) Number of positive samples; % of positive samples; (CI)	Количество исследованных образцов Sample size	Количество положительных; % положительных; (ДИ) Number of positive samples; % of positive samples; (CI)
Нижняя Гвинея/Lower Guinea	954	9; 0,9%; (0,5–1,8%)	741	46; 6,2%; (4,7–8,2%)
Средняя Гвинея/Middle Guinea	769	15; 1,9%; (1,2–3,2%)	492	16; 3,3%; (2,01–5,2%)
Верхняя Гвинея/Upper Guinea	240	12; 5,0%; (2,9–8,5%)	464	23; 4,96%; (3,3–7,3%)
Лесная Гвинея/Forest Guinea	173	15; 8,7%; (5,3–13,8%)	649	39; 6,0%; (4,4–8,1%)
Итого по стране/Total across the country	2136	51; 2,1%; (1,8–3,1%)	2346	124; 5,3%; (4,5–6,3%)

Примечание. *По данным Каливоги С. и соавт.

Note. *According to Kalivogui S. et al.

преимущественно в регионе Нижней Гвинеи (Киндиа, Боке, Боффа). Однако, по данным некоторых авторов, социально-экономические условия жизни людей не являются определяющим фактором при изучении распространения коксиеллеза на африканском континенте. Тесный контакт между людьми и сельскохозяйственными животными происходит как в сельской местности, так и в городских условиях [9, 12].

Также обращает на себя внимание тот факт, что в настоящее время общий процент выявления антител класса IgG к *S. burnetii* в сыворотках крови людей выше, чем в 80-е гг. прошлого столетия (5,3 и 2,1% соответственно) (табл.). Возможно, это связано с тем, что метод ИФА, использованный в нашем исследовании, является более чувствительным и специфичным, по сравнению с методом РСК, которым пользовались ранее.

Объяснение данного явления в настоящее время может быть только гипотетическим, основанным либо на изменениях социально-экономических особенностей региона, либо на естественных колебаниях активности природного очага. Невозможность формулирования однозначной гипотезы, объясняющей динамику роста или снижения количества выявленных серопозитивных лиц, связана, прежде всего, с отсутствием систематического мониторинга инфекции.

Таким образом, настоящее исследование подтверждает циркуляцию *S. burnetii* во всех ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики. Природно-климатические условия

страны, разнообразие обитающих на данной территории видов иксодовых клещей, которые являются резервуарами и переносчиками инфекции, а также большое количество сельскохозяйственных животных, находящихся в личной собственности населения, являются предпосылками для активной циркуляции возбудителя лихорадки Ку и возникновению вспышек заболевания. Если учитывать большую эпидемиологическую значимость данной инфекционной болезни, то актуальной задачей остается дальнейшее изучение вопроса о доле лихорадки Ку в общей структуре лихорадок, регистрируемых на территории Республики Гвинея. Также необходимо проведение эпизоотологического мониторинга с целью определения видов носителей и переносчиков *S. burnetii* в разных ландшафтно-географических зонах Гвинейской Республики и изучение уровня иммунной прослойки к возбудителю у крупного и мелкого рогатого скота, являющихся основными источниками заражения людей [1, 12]. Полученные сведения позволят установить природную очаговость данной инфекции и провести профилактические (противоэпидемические) мероприятия.

Исследование выполнялось в рамках распоряжений Правительства РФ № 1448-р от 15.07.2016 и № 2904-р от 22.12.2017 о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Список литературы/References

1. Каливоги С., Буаро М.Е., Константинов О.К., Плотникова Л.Ф. Иммунная структура населения и домашних животных Гвинейской Республики в отношении риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки и лихорадки Ку // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2013. № 1. С. 28–30. [Kalivogui S., Boiro M.E., Konstantinov O.K., Plotnikova L.F. The immune structure against Q-fever and tick-bite spotted fever group rickettsioses in the population and domestic animals of the Republic of Guinea. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Diseases*, 2013, no. 1, pp. 28–30 (In Russ.)]
2. Лопатин А.А., Найденова Е.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Уткин Д.В., Касьян Ж.А., Крицкий А.А., Терновой В.А., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Демина Ю.В., Хорошилов В.Ю., Попова А.Ю., Кутырев В.В. Изучение сохранения вируса Эбола в биологических жидкостях пациента на поздних стадиях выздоровления // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. № 3. С. 73–77. [Lopatin A.A., Naidenova E.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Utkin D.V., Kas'yan Z.A., Kritsky A.A., Ternovoy V.A., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Demina Y.V., Khoroshilov V.Y., Popova A.Y., Kutuyev V.V. Studies of Ebola virus persistence in the body fluids of a patient at advanced stages of convalescence. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2015, no. 3, pp. 73–76. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2015-3-73-76
3. Найденова Е.В., Захаров К.С., Никифоров К.А., Карташов М.Ю., Агафонов Д.А., Касьян Ж.А., Плеханов Н.А., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Пьянков С.А., Крицкий А.А., Оглодин Е.Г., Уткин Д.В., Баяндин Р.Б., Кабанов А.С., Сергеев А.А., Диалло М.Г., Нурдин И., Тупу Ж.-П., Диалло М., Кутырев И.В., Раздорский А.С., Сафронов В.А., Лопатин А.А., Бумбали С., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Кутырев В.В. Итоги и перспективы изучения некоторых природно-очаговых инфекционных болезней в Гвинейской Республике. В кн.: Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под ред. А.Ю. Поповой. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. С. 150–156. [Naydenova E.V., Zakharov K.S., Nikiforov K.A., Kartashov M.Yu., Agafonov D.A., Kasyan Zh.A., Plekhanov N.A., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Pyankov S.A., Kritsky A.A., Oglodin E.G., Utkin D.V., Bayandin R.B., Kabanov A.S., Sergeev A.A., Diallo M.G., Nurdin I., Tupu Zh.P., Diallo M., Kutuyev I.V., Razdorsky A.S., Safronov V.A., Lopatin A.A., Boumbali S., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Kutuyev V.V. Results and prospects of studying some natural focal infectious diseases in the Republic of Guinea. In: Current infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnostics, immunity / Ed. by A.Yu. Popova. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2017, pp. 150–156. (In Russ.)]
4. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л., Старшинов В.А., Щербакова С.А., Малеев В.В. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. Т. 7, № 3. С. 102–108. [Naydenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silly A.L., Starshinov V.A., Shcherbakova S.A., Maleev V.V. Ensuring biological safety during the implementation of anti-epidemic measures in the period of liquidation of the Ebola fever epidemic in the Republic of Guinea // *Infectious Diseases: News, Opinions, Education*. 2018. T. 7, No. 3. P. 102–108.]

- Levkovskiy A.E., Silla A.L., Starshinov V.A., Shcherbakova S.A., Maleev V.V. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the epidemic Ebola fever in the Republic of Guinea. *Infektsionnye bolezni: novosti, mnenia, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2018, vol. 7, no. 3, pp. 102–108. (In Russ.)* doi: 10.24411/2305-3496-2018-13015
5. Население Гвинеи // Countrymeters. URL: <http://countrymeters.info/ru/guinea> (25.10.2020)
 6. Панферова Ю.А. Молекулярные основы патогенности *Coxiella burnetii* // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 1. С. 7–24. [Panferova Yu.A. *Coxiella burnetii* pathogenicity molecular basis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 7–24. (In Russ.)*] doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24
 7. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. 2-е изд., переработанное и дополненное. М.: ООО «Буква», 2014. 284 с. [Specific indication of pathogenic biological agents: a practical guide / Eds.: G.G. Onishchenko, V.V. Kutyrev. 2nd ed., revised and supplemented. Moscow: *Bukva, 2014. 284 p. (In Russ.)*]
 8. Черч Гаррисон Р.Дж. Западная Африка. Природная среда и ее хозяйственное использование. М.: Издательство иностранной литературы, 1959. 470 с. [Church Harrison R.J. West Africa: a study of the environment and of man's use of it. Moscow: *Foreign literature publishing house, 1959. 470 p. (In Russ.)*]
 9. Mediannikov O., Fenollar F., Socolovschi C., Diatta G., Bassene H., Molez J.-F., Sokhna C., Trape J.-F., Raoul D. *Coxiella burnetii* in Humans and Ticks in Rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 4: e654. doi: 10.1371/journal.pntd.0000654
 10. Noden B.H., Tshavuka F.I., van der Colf B.E., Chipare I., Wilkinson R. Exposure and risk factors to *Coxiella burnetii*, spotted fever group and typhus group rickettsiae and bartonella henselae among volunteer blood donors in Namibia. *PLoS One*, vol. 9, no. 9: e108674. doi:10.1371/journal.pone.0108674
 11. Prabhu M., Nicholson W.L., Roche A.J., Kersh G.J., Fitzpatrick K.A., Oliver L.D., Massung R.F., Morrissey A.B., Bartlett J.A., Onyango J.J., Maro V.P., Kinabo G.D., Saganda W., Crump J.A. Q Fever, spotted fever group, and typhus group rickettsioses among hospitalized febrile patients in Northern Tanzania. *Clin. Infect. Dis.*, 2011, vol. 53, no. 4: e8-15. doi: 10.1093/cid/cir411
 12. Vanderburg S., Rubach M.P., Halliday J., Cleveland S., Reddy E.A., Crump J.A. Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a one health systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 4: e2787. doi: 10.1371/journal.pntd.0002787

Авторы:

Найденова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории вирусологии отдела диагностики инфекционных болезней, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Каливоги С., к.б.н., научный консультант Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Республика Гвинея;

Карташов М.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник отдела флавивирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Бойко А.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории оперативной диагностики отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Бумбали С., к.б.н., заместитель директора Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Республика Гвинея;

Сафронов В.А., к.м.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Захаров К.С., к.б.н., научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Нассер А., стажер Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Республика Гвинея;

Драме Ф., стажер Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Республика Гвинея;

Константинов О.К., к.б.н., научный сотрудник Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Республика Гвинея;

Магассуба Н'Ф., к.м.н., доцент кафедры медицинской микробиологии, Университет им. Гамаль Абдель Насера, Конакри, Республика Гвинея;

Буаро М., к.б.н., директор Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Республика Гвинея;

Щербаклова С.А., д.б.н., заместитель директора ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Кутырев В.В., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия.

Authors:

Naidenova E.V., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Virology, Department of Infectious Diseases Diagnostics, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Kalivogui S., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

Kartashov M.Yu., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Department of Flavivirus Infections, State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Boiko A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Operative Diagnostics of the Department of Diagnostics of Infectious Diseases, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Boumbaly S., PhD, MD (Biology), Deputy Director of the Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

Safonov V.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Department of Epidemiology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Zakharov K.S., PhD, MD (Biology), Researcher, Department of Epidemiology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Nassour A., Research Assistant Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

Drame F., Research Assistant Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

Konstantinov O.K., PhD, MD (Biology), Researcher, Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

Magassouba N'F., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Medical Microbiology, University Gamal Abdel Nasser, Conakry, Republic of Guinea;

Boiro M., PhD, MD (Biology), Director of the Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

Scherbakova S.A., PhD, MD (Biology), Deputy Director of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Kutyrev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ К ВИРУСАМ КОРИ И КРАСНУХИ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ СЕРБИЯ

М.А. Бичурина¹, С.Б. Филипович-Вигньевич², А.Ю. Антипова¹, М.Д. Банцевич²,
И.Н. Лаврентьева¹

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия

Резюме. *Введение.* Согласно стратегическому плану ВОЗ, в 2020 г. корь должна быть элиминирована в пяти из шести регионов ВОЗ, в том числе в Европейском регионе. Однако в разных европейских странах периодически регистрируются крупные вспышки кори. В Республике Сербия (РС) в 2018 г. выявлено 5076 случаев кори, из них 15 — с летальным исходом. Цель исследования — изучение популяционного иммунитета к вирусу кори и вирусу краснухи у населения Республики Сербия. *Материалы и методы.* На наличие антител класса IgG к вирусам кори и краснухи были исследованы образцы сывороток крови, полученных в 2018 и 2019 гг. от условно здоровых жителей Республики Сербия пяти возрастных групп: I — дети с 2 до 6 лет, II — дети с 8 до 14 лет, III — с 15 до 24 лет, IV — с 25 до 49 лет, V — старше 50 лет. Всего было получено 1000 образцов, по 200 сывороток в каждой группе. Использованы ИФА тест-системы Enzygnost® Anti-Measles virus/IgG и Enzygnost® Anti-Rubella virus/IgG (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. *Результаты.* В целом около 23,0% обследованных лиц не имели антител класса IgG к вирусу кори, у 33,7% регистрировали «низкий» уровень антител ($\geq 275,0$ — $\leq 1000,0$ МЕ/л). В I группе 60% детей или не имели антител (АТ) (29,5%), или имели «низкий» их титр (30,5%). IgG-корь «низкого» уровня преобладали у лиц из II и III групп ($p < 0,05$). У трети детей в возрасте от 8 до 14 лет были обнаружены IgG-корь антитела в «высоком» титре ($> 3000,0$ МЕ/л), что может быть доказательством недавно перенесенной кори. Аналогичные результаты получены при определении IgG-антител к вирусу краснухи в тех же возрастных группах. *Обсуждение.* Результаты исследования свидетельствуют о нарушениях плановой иммунизации против кори и краснухи детей в возрасте 12–15 месяцев (первичная иммунизация) и 6–7 лет (ревакцинация) трехкомпонентной вакциной MMR и подтверждаются официальными данными по охвату прививками против кори и краснухи в Республике Сербия.

Ключевые слова: Республика Сербия, коллективный иммунитет, иммунизация, вирус, корь, краснуха.

A HERD IMMUNITY TO MEASLES AND RUBELLA VIRUSES IN THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF SERBIA

Bichurina M.A.^a, Filipović-Vignjević S.^b, Antipova A.Yu.^a, Bančević M.^b, Lavrentieva I.N.^a

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Virology, Vaccines and Sera “Torlak”, Belgrade, Serbia

Abstract. According to the WHO Strategic Plan, measles should be eradicated in 2020 in the five WHO Regions including European Region. However, large measles outbreaks are being periodically registered in diverse European countries. In the Republic of Serbia (SRB), 5,076 measles cases were detected in 2018, among which 15 cases were fatal. Aim

Адрес для переписки:

Антипова Анастасия Юрьевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-11. E-mail: anti130403@mail.ru

Contacts:

Anastasia Yu. Antipova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-11. E-mail: anti130403@mail.ru

Для цитирования:

Бичурина М.А., Филипович-Вигньевич С.Б., Антипова А.Ю., Банцевич М.Д.,
Лаврентьева И.Н. Популяционный иммунитет к вирусам кори и краснухи
у населения Республики Сербия // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11,
№ 1. С. 171–176. doi: 10.15789/2220-7619-TTO-1496

Citation:

Bichurina M.A., Filipović-Vignjević S., Antipova A.Yu., Bančević M.,
Lavrentieva I.N. A herd immunity to measles and rubella viruses in the
population of the Republic of Serbia // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 171–176.
doi: 10.15789/2220-7619-TTO-1496

of the study was to examine herd immunity to measles and rubella viruses in the population of the Republic of Serbia. *Materials and methods.* Blood serum samples obtained in 2018 and 2019 from conditionally healthy residents of the Republic of Serbia were tested for the presence of IgG antibodies to measles and rubella viruses in five age groups: I — children from 2 to 6 years old, II — children from 8 to 14 years old, III — 15 to 24 years old, IV — 25 to 49 years old and V — over 50 years old. A total of 1000 samples were obtained, 200 sera in each group. Enzygnost® Anti-Measles virus/IgG and Enzygnost® Anti-Rubella virus/IgG ELISA test systems (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Germany) were used according to the manufacturer's instructions. *Results.* Overall, around 23.0% and 33.7% of the surveyed persons had no or low level of anti-measles IgG antibody ($\geq 275.0 - \leq 1000.0$ IU/l). In age group I, 60% children contained no or "low" anti-measles antibodies titer (29.5% and 30.5%, respectively). In addition, low antibody titer level was mainly detected in individuals from age group II and III ($p < 0.05$). A third of children under 8–14 contained high IgG-antibodies titer against measles (> 3000.0 IU/l) that might serve as an evidence that such subjects recently recovered after measles. Similar results were obtained for IgG antibodies to rubella in the same age groups. *Discussion.* The study results evidence about altered routine immunization against measles and rubella in children aged 12–15 months (first vaccination) and those at age of 6–7 years (revaccination) with MMR vaccine. The data obtained correlate with official data on coverage with measles and rubella vaccines in the Republic of Serbia.

Key words: Republic of Serbia, herd immunity, immunization, virus, measles, rubella.

Введение

Начиная с 2005 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) реализует стратегический план по борьбе с корью, в соответствии с которым поставлена цель снижения смертности от кори в глобальном масштабе и элиминации инфекции в отдельных регионах мира [11]. Сроки выполнения плана неоднократно корректировались, были перенесены вначале с 2010 на 2015 г., а потом на 2020 г. [9, 12]. В настоящее время глобальной целью стратегического плана по элиминации кори, краснухи и врожденной краснухи является достижение элиминации кори в пяти из шести регионов ВОЗ, в том числе в Европейском регионе.

Однако, несмотря на наличие доступных высокоиммуногенных вакцин, периодически возникают крупные вспышки кори не только в развивающихся, но и в индустриально развитых странах [1, 3, 6, 7].

В Европейском регионе ВОЗ, после снижения числа случаев кори в 2016 г., в 2017 г. было зарегистрировано 23 927 случаев, а в 2018 г. заболеваемость корью выросла до 82 599 случаев. Наиболее пораженными странами оказались Украина (53 218 случаев), Республика Сербия (РС) (5076 случаев), Грузия (2203 случая) и Израиль (2919 случаев) [5, 14]. В пяти странах Европейского региона ВОЗ (Украина, РС, Израиль, Франция и Италия) в 2018 г. был выявлен 81% случаев кори от всего числа случаев, документированных в регионе [6, 10, 15]. Кроме того, в 2018 г. было зарегистрировано 72 случая смерти от кори в 10 странах Европейского региона. Наибольшее число летальных исходов было документировано в Румынии (22 случая), на Украине (15 случаев) и в РС (15 случаев). Среди заболевших 47% составили невакцинированные, а у 26% больных вакцинный статус был не известен. Чаще всего болели лица в возрасте от 20 лет и старше.

В 2019 г. корь продолжала распространяться в Европейском регионе ВОЗ. Всего зарегистрировано 104 420 случаев кори. Наибольшее число случаев было выявлено на Украине ($n = 57\,332$), в Казахстане ($n = 13\,326$), в Российской Федерации ($n = 4161$), Греции ($n = 3920$), Турции ($n = 2890$).

Ситуация по краснухе в Европейском регионе ВОЗ относительно благополучная. В 2019 г. было зарегистрировано 634 случая, в том числе в Польше — 292 случая, на Украине — 142 случая.

Важным элементом эпидемиологического надзора за корью и краснухой является слежение за состоянием специфического иммунитета к вирусам кори и краснухи, который позволяет оценить не только эффективность и качество проводимой специфической профилактики этих инфекций, но и выявить наличие скрыто протекающего эпидемического процесса. Цель исследования — изучение популяционного иммунитета к вирусам кори и краснухи у населения РС.

Материалы и методы

На наличие антител класса IgG к вирусам кори и краснухи (IgG-корь и IgG-краснуха) исследовано 1000 образцов сывороток крови, полученных от условно здоровых жителей РС, разделенных на 5 возрастных групп: I — дети 2–6 лет, получившие, возможно, первую дозу вакцины MMR за 1 год — 5 лет до момента исследования; II — дети 8–14 лет, которым должна была быть введена вторая доза вакцины за 1 год — 8 лет до момента исследования; III — лица 15–24 лет; IV — 25–49 лет; V — старше 50 лет. Взятие крови осуществлялось с октября 2018 г. по июнь 2019 г. В каждой группе было исследовано по 200 образцов.

Исследование сывороток крови проводили в ИФА с тест-системами Enzygnost® Anti-Measles virus/IgG и Enzygnost® Anti-Rubella virus/IgG (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH,

Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки результатов использовали протокол ВОЗ [13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0.05$.

Результаты

В РС в соответствии с национальным календарем прививок дети получают вакцину ММР (корь+краснуха+паротит) дважды: первую дозу в 12–15 месяцев, вторую дозу в 6–7 лет (до школы).

Данные о наличии IgG-корь у лиц разного возраста в РС представлены в табл. 1.

Показано, что в группах I, III и IV доля положительных к вирусу кори сывороток крови статистически значимо ниже, чем во II и V группах ($p < 0,05$). Высокая доля (30,0%) серонегативных лиц в первой группе свидетельствует о недостаточном охвате при проведении вакцинации детей первой дозой вакцины. Во II группе, у детей, которые должны были недавно получить вторую дозу вакцины, отмечено снижение процента серонегативности (15,0%). В III и IV группах, на отдаленных сроках после ревакцинации (10 и более лет), вновь констатировали увеличение числа серонегативных к вирусу кори лиц (29,9 и 34,2% соответственно). Увеличение доли серопозитивных к вирусу кори в V группе (старше 50 лет) до 89,5% связано, очевидно, с тем, что данную возрастную группу составили преимущественно лица, переболевшие инфекцией в прошлом. Как известно, корь оставляет пожизненный иммунитет.

Основная часть обследованных лиц была из Белграда. Только в IV группе, в которой был выявлен самый низкий процент серопозитивных лиц к вирусу кори (65,8%), оказалось возможным распределение по четырем отдельным территориям. На двух территориях, Белград и Лазаревац, процент серопозитивных лиц был статистически достоверно ниже ($p < 0,05$) (64,5 и 48,8% соответственно) по сравнению с двумя другими территориями — Уб и Обреновац (73,0 и 77,5% соответственно).

Не было выявлено существенных различий в количестве серопозитивных к вирусу кори мужчин и женщин во всех рассматриваемых возрастных группах. В целом среди женщин процент положительных результатов составил 78,4%, среди мужчин — 74,1%.

Распределение сывороток крови у лиц разного возраста по уровню IgG-корь представлено в табл. 2.

В соответствии с инструкцией изготовителя тест-системы на IgG-корь сыворотки с показа-

телем не более 275 МЕ/л считали отрицательными. Данные сыворотки были отнесены в отдельную подгруппу. Все сыворотки с показателем выше 275 МЕ/л расценивались как положительные. Данные сыворотки распределены на три подгруппы. В первую подгруппу вошли сыворотки с показателем 275,0–1000,0 МЕ/л (условно «низкие» титры), возможно, обусловленным наличием поствакцинальных антител. Вторую подгруппу составили сыворотки с показателем 1000,0–3000,0 МЕ/л (условно «средние» титры), который мог быть следствием присутствия как поствакцинальных антител, так и антител, приобретенных после перенесенной инфекции в прошлом. В третью подгруппу были включены сыворотки с высоким показателем — от 3000,0 до 5000,0 и более МЕ/л. Такой результат могли дать постинфекционные антитела, которые сформировались или после недавно перенесенной инфекции, или после перенесенного заболевания в прошлом.

Анализ полученных результатов показал, что в целом около 23,0% обследованных лиц не имели IgG-корь, у 33,7% регистрировали низкий уровень IgG-корь, а у 28,4% выявлен высокий уровень антител.

В I возрастной группе 60% детей или не имели антител (29,5%), или имели их в «низком» титре (30,5%). Антитела IgG-корь «низкого» уровня преобладали в возрастных группах 8–14 лет и 15–24 года (41,5 и 49,7% соответственно), эти показатели статистически значимо ниже, чем в остальных трех группах ($p < 0,05$). Доля сывороток со средним уровнем IgG-корь во всех возрастных группах колебалась незначительно (от 11,0% во II группе до 17,5% в I группе). Наибольшая доля сывороток с высоким уровнем IgG-корь выявлена в V группе у лиц старше 50 лет (49,0%); показатель был статистически значимо выше по сравнению с аналогичными показателями во всех остальных четырех

Таблица 1. Наличие антител IgG-корь у лиц разного возраста в Республике Сербия

Table 1. Detected anti-measles IgG antibodies in diverse age groups in the Republic of Serbia

№ группы No. of group	Возраст, лет Age, years	Число обследованных лиц Number of the subjects examined	Из них IgG-корь+ IgG-measles+ among subjects	
			абс. abs.	%M±m
I	2–6	200	141	70,0±3,2
II	8–14	200	170	85,0±2,5
III	15–24	201	141	70,1±3,2
IV	25–49	199	131	65,8±3,4
V	≥ 50	200	179	89,5±2,2
Итого Total		1000	762	76,2±1,3

Таблица 2. Уровень IgG-корь у лиц разного возраста в Республике Сербия

Table 2. Detected IgG-antibodies against measles in diverse age groups in the Republic of Serbia

№ группы No. of group	Возраст, лет Age, years	Число исследованных сывороток The number of examined serum samples	Из них уровень IgG-корь, МЕ/л Titer of IgG-measles antibody among subjects, IU/l							
			≤ 275,0		≥ 275,0 – ≤ 1000,0		> 1000,0 – ≤ 3000,0		> 3000,0	
			абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
I	2–6	200	59	29,5	61	30,5	35	17,5	45	22,5
II	8–14	200	30	15,0	83	41,5	22	11,0	65	32,5
III	15–24	201	50	24,9	100	49,7	30	15,0	21	10,4
IV	25–49	199	68	34,2	47	23,6	29	14,6	55	27,6
V	≥ 50	200	22	11,0	46	23,0	34	17,0	98	49,0
Итого Total		1000	229	22,9	337	33,7	150	15,0	284	28,4

группах ($p < 0,05$). У $\frac{1}{3}$ детей в возрасте 8–14 лет также обнаружены IgG-корь в «высоком» титре, что может быть обусловлено участием этой группы детей в подъеме заболеваемости корью в РС в последние годы.

Доля лиц, имеющих суммарно средний и высокий уровни антител IgG-корь, колебалась от 25,4% (III возрастная группа) до 66% (V возрастная группа).

Полученные результаты говорят о недостатках плановой вакцинации детей первой дозой вакцины MMR. Об этом же свидетельствуют и результаты, полученные при исследовании сывороток крови детей в отношении IgG-краснуха (табл. 3).

В I группе доля серопозитивных лиц к вирусу краснухи составила только 72,0% и была сравнима с результатами в отношении вируса кори (70,0%). В остальных возрастных группах (II–V) доля серопозитивных лиц к вирусу краснухи была статистически достоверно выше, чем в I группе ($p < 0,05$). Был проведен анализ показателей уровня IgG-краснуха у лиц разного возраста в РС.

Таблица 3. Наличие IgG-краснуха у лиц разных возрастных групп в Республике Сербия

Table 3. IgG-rubella in subjects of diverse age groups in the Republic of Serbia

№ группы No. of group	Возраст, лет Age, years	Число обследованных лиц Number of the subjects examined	Из них IgG-краснуха+ IgG-rubella+ among subjects	
			абс. abs.	%M±m
I	2–6	200	144	72,0±3,2
II	8–14	200	178	89,0±2,2
III	15–24	201	171	85,0±2,5
IV	25–49	199	178	89,5±2,0
V	≥ 50	200	187	93,5±1,7
Итого Total		1000	861	86,1

В соответствии с инструкцией изготовителя сыворотки крови с показателем не более 11,0 МЕ/мл были отнесены к отрицательным. Эти сыворотки составили первую подгруппу. Положительные сыворотки (более 11,0 МЕ/мл) условно распределены на четыре подгруппы с интервалом в 50,0 МЕ/мл. Самая большая доля отрицательных сывороток (28,0%) была в группе детей в возрасте 2–6 лет (I группа), что свидетельствует о недостаточном охвате этой группы первой дозой вакцины MMR. Данные по распределению титра антител к вирусу краснухи по группам несколько отличаются от аналогичных данных по кори. Во II и III возрастных группах отмечена высокая доля лиц, имеющих IgG-антитела в низкой или средней концентрации: до 100,0 МЕ/мл (69,0 и 63,2% соответственно), при этом высокий уровень IgG (более 150,0 МЕ/мл) имела незначительная часть обследованных лиц 8–14 и 15–24 лет (11,0 и 13,9% соответственно). Вместе с тем, как и при обследовании на IgG-корь, с увеличением возраста нарастает процент лиц, имеющих высокий уровень антител ($\geq 150,0$ МЕ/мл).

Обсуждение

Как упоминалось выше, в РС плановой иммунизации против кори и краснухи подлежат дети в возрасте 12–15 месяцев (первичная вакцинация) и 6–7 лет, до поступления в школу (ревакцинация). Проведенный анализ выявил недостатки в проведении плановой иммунизации против этих инфекций в РС. Высокая доля серонегативных лиц или лиц, имеющих низкий уровень антител (АТ), в I возрастной группе свидетельствует о большом количестве непривитых или неудачно привитых против кори детей в возрасте 2–6 лет. В целом в первой группе не имели антител к вирусу кори 59 детей. При этом у 52 детей (88,1%) отсутствовали антитела и к вирусу краснухи, что подтверждает наличие нарушений в проведении вакцинации

первой дозой MMR. При этом различаются две территории в РС (Т78 и L50), на которых у 35 из 52 детей (67,3%) отсутствовали антитела к вирусам кори и краснухи.

Кроме того, документирован недостаточно напряженный иммунитет против кори у детей и подростков, которые должны были получить ревакцинирующую дозу вакцины MMR в недавнем прошлом и быть максимально защищенными. Можно предположить, что низкие титры АТ, выявленные почти у половины детей и взрослых в возрасте от 8 до 24 лет, обусловлены тем, что эти лица получили только первую дозу вакцины, а однократная иммунизация не обеспечила длительного напряженного иммунитета. Высокие и средние титры АТ, выявляющиеся в этих же возрастных группах (II и III группы) в сопоставимых долях, могут быть обусловлены тем, что некоторые лица данных возрастных групп, будучи незащищенными, перенесли корь в последние годы. Действительно, у $\frac{1}{3}$ лиц в возрасте 8–14 лет обнаружены IgG-корь в высоком титре, что может быть обусловлено участием этой группы детей в подъеме заболеваемости корью в РС в последние годы [5, 10].

Нарушения плановой вакцинации вакциной MMR в РС косвенно подтверждаются и показателями напряженности коллективного иммунитета к вирусу краснухи, полученными в данном исследовании. Только 72% обследованных детей 2–6 лет имели IgG-краснуха, то есть около трети лиц данной возрастной группы были не привиты или привиты неудачно.

Доля серопозитивных к краснухе детей старше 8 лет, подростков и взрослых повышается до 85–89%, а среди лиц старше 50 лет достигает 93%. Однако около половины сывороток II и III возрастных групп содержали IgG-краснуха в низкой концентрации (11–50 МЕ/мл), что коррелирует с данными, полученными в этих же группах в отношении титров IgG-корь. Данные показатели могут быть косвенным подтверждением отсутствия ревакцинирующей прививки у существенной части лиц в возрасте от 8 до 24 лет.

Согласно официальным данным [8], в РС в течение последних десяти лет двумя дозами вакцины были привиты менее 95%. Так, в 2017 г. первой дозой вакцины были привиты 85,2% детей, второй дозой — 91,6% [10].

С 2013 г. в РС, как и в Российской Федерации, была отмечена активизация антивакцинальной кампании и отказ родителей от иммунизации детей. В связи с этим накопилась критическая масса непривитых лиц и, вероятно, снизилась напряженность коллективного иммунитета, что подтверждается большой вспышкой кори (5798 случаев) с 15 летальными исходами [5], которая имела место в РС в 2017–2018 гг.

Наибольший процент сывороток с высоким уровнем IgG-корь выявлен в V группе, у лиц старше 50 лет (49,0%), он был статистически значимо выше по сравнению с аналогичными показателями во всех остальных четырех группах ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют об активном участии этой группы населения в эпидемическом процессе кори в предыдущие годы. С увеличением возраста нарастает и доля лиц, имеющих высокий уровень антител к вирусу краснухи ($\geq 150,0$ МЕ/мл). Это может свидетельствовать о естественном проэпидемичивании населения.

Полученные результаты согласуются с исследованиями, проведенными ранее в России: в рамках пилотного проекта МЗ РФ и ВОЗ была проведена оценка истинной защищенности от кори населения территорий со спорадическим уровнем заболеваемости [2, 4]. Отмечалась тенденция нарастания числа серонегативных лиц с увеличением возраста, а также с длительностью срока после ревакцинации (15 лет и более). В дальнейшем было показано, что на территории северо-запада России доля серонегативных лиц к вирусу кори повысилась во всех возрастных группах, особенно у подростков 16–17 лет [3].

В целом полученные результаты свидетельствуют о необходимости совершенствования вакцинопрофилактики кори и краснухи в РС.

Список литературы/References

1. Бичурина М.А., Тимофеева Е.В., Железнова Н.В., Игнатьева Н.А., Шульга С.В., Лялина Л.В., Дегтярев О.В. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 году // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 2. С. 96–102. [Bichurina M., Timofeeva E., Zheleznova N., Ignatyeva N., Shulga R., Lyalina L., Degtyarev O. Measles outbreak in a children's hospital in Saint Petersburg in 2012. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 96–102. (In Russ.)]
2. Результаты сертификации территорий СЗФО на отсутствие циркуляции эндемического вируса кори: аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2012. 60 с. [Results of certification of the territories of NFD for the absence of endemic measles virus circulation: analytical review. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2012. 60 p. (In Russ.)]
3. Ситуация по кори на территориях Северо-Западного федерального округа и трудности диагностики при спорадическом уровне заболеваемости: аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. 76 с. [The situation of measles in the North-Western federal district and the difficulties of diagnosis with sporadic morbidity: an analytical review. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2017. 76 p. (In Russ.)]
4. Совершенствование эпидемиологического надзора за корью в Северо-Западном федеральном округе России на этапе ликвидации инфекции: аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2008. 52 с. [Improving epidemiologi-

- cal surveillance for measles in the North-Western federal district of Russia at the stage of infection elimination: analytical review. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2008. 52 p. (In Russ.)*
5. Actual epidemiological situation of measles in Serbia. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia, 2019. URL: <http://www.batut.org.rs/index.php?content=1629> (25.12.2019)
 6. Andrianou X.D., Del Manso M., Bella A., Vescio M.F., Baggieri M., Rota M.C., Pezzotti P., Filia A. Spatiotemporal distribution and determinants of measles incidence during a large outbreak, Italy, September 2016 to July 2018. *Eurosurveillance, 2019, vol. 24, no. 17: 1800679. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.17.1800679*
 7. CDC. Increased Transmission and Outbreaks of Measles — European Region, 2011. *MMWR, 2011, vol. 60, no. 47, pp. 1605–1610.*
 8. Nedeljković J., Rakić-Adrović S., Tasić G., Kovačević-Jovanović V., Lončarević G., Hübschen J.M., Müller C.P. Resurgence of measles in Serbia 2010–2011 highlights the need for supplementary immunization activities. *Epidemiol. Infect., 2016, vol. 144, no. 5, pp. 1121–1128. doi: 10.1017/S0950268815002277*
 9. Orenstein W.A., Hinman A., Nkowane B., Olive J.M., Reingold A. Measles and rubella global strategic plan 2012–2020 midterm review. *Vaccine, 2018, vol. 36, no. 1: A1–A34. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.09.026*
 10. Ristić M., Milošević V., Medić S., Djekić Malbaša J., Rajčević S., Boban J., Petrović V. Seroepidemiological study in prediction of the risk groups for measles outbreaks in Vojvodina, Serbia. *PLoS One, 2019, vol. 14, no. 5: e0216219. doi: 10.1371/journal.pone.0216219*
 11. WHO. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005–2010. *Copenhagen: WHO, 2005. 34 p.*
 12. WHO. Global Vaccine Action Plan 2011–2020. *Geneva: WHO, 2013. 77 p.*
 13. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2nd ed. *Geneva: WHO, 2006. 22 p.*
 14. WHO. Measles — European Region. 2019. URL: <https://www.who.int/csr/don/06-may-2019-measles-euro/en> (25.12.2019)
 15. Zimmerman L.A., Muscat M., Singh S., Ben Mamou M., Jankovic D., Datta S., Alexander J.P., Goodson J.L., O'Connor P. Progress toward measles elimination — European Region, 2009–2018. *MMWR, 2019, vol. 68, no. 17, pp. 396–401.*

Авторы:

Бичурина М.А., д.м.н., зав. вирусологической лабораторией центра по элиминации кори и краснухи, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Филипович-Вигньевич С.Б., врач, ассистент директора по диагностике и научному развитию, руководитель национальной референс-лаборатории по гриппу, Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия;

Антипова А.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Банцевич М.Д., д.м.н., специалист в области медицинской микробиологии, зав. национальной референс-лабораторией по кори и краснухе, Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия;

Лаврентьева И.Н., д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Authors:

Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Virological Laboratory of Measles and Rubella Elimination, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Filipović-Vignjević S.B., Doctor, Assistant Director for Diagnostics and Scientific Development, Head of National Reference Laboratory for Influenza, Institute of Virology, Vaccine and Sera "Torlak", Belgrade, Serbia;

Antipova A.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Bančević M.D., PhD, MD (Medicine), Specialist in Medical Microbiology, Head of National Reference Laboratory for Measles and Rubella, Institute of Virology, Vaccine and Sera "Torlak", Belgrade, Serbia;

Lavrentieva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОПИСТОРХОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

С.А. Григорьева, А.Н. Косырева, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова,
И.В. Бакштановская, Г.А. Кальгина, Л.В. Курлаева

ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Тюмень, Россия

Резюме. Целью исследования было выявление взаимосвязи между полиморфизмами, ассоциированными с развитием ишемической болезни сердца, и патогенетическими особенностями описторхозной инвазии. Проведено сопоставление лабораторных показателей функционирования иммунной системы организма (выявленные методом проточной цитометрии фенотипы лимфоцитов, концентрации иммуноглобулинов и цитокинов, показатели неспецифической резистентности) у больных хроническим описторхозом (вызванным *Opisthorchis felineus*) с различными генотипами — наличием и отсутствием мутаций в локусах, ассоциированных с предрасположенностью к развитию ишемической болезни сердца. Обнаружено, что при обусловленных мутациями нарушениях функций аденозинмонофосфат-дезаминазы 1, индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа, аполипопротеина Е по сравнению с пациентами без минорных аллелей, воздействие описторхозной инвазии приводит к изменению иммунного реагирования. При этом у пациентов, имеющих мутацию гена аденозинмонофосфат-дезаминазы 1, обнаружена меньшая выраженность адаптивного клеточного иммунитета (сниженное количество цитотоксических лимфоцитов), адаптивного гуморального иммунитета (сниженное количество иммуноглобулина А). У больных описторхозом, имеющих редкий аллель гена индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа, выявлена активация адаптивного иммунитета и снижение активации врожденного иммунитета. Наличие мутации гена аполипопротеина Е приводит к снижению активности адаптивного клеточного иммунного ответа, что усугубляет течение описторхозной инвазии. Наличие минорного аллеля полиморфизма rs1333049 гена ингибиторов циклин-зависимой киназы не приводит к значительным изменениям иммунного реагирования. Таким образом, при обусловленных мутациями нарушениях функций определенных белков воздействие описторхозной инвазии приводит к разнонаправленным изменениям показателей иммунного ответа, при этом приближение показателей разных звеньев иммунной

Адрес для переписки:

Григорьева Светлана Андреевна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (3452) 28-99-93.
E-mail: info@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Svetlana A. Grigorieva
625026, Russian Federation, Tyumen, Respubliki str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 (3452) 28-99-93.
E-mail: info@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Для цитирования:

Григорьева С.А., Косырева А.Н., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б.,
Бакштановская И.В., Кальгина Г.А., Курлаева Л.В. Показатели иммунной
системы у пациентов с хроническим описторхозом в зависимости
от полиморфизмов генов, ассоциированных с развитием ишемической
болезни сердца // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 177–183.
doi: 10.15789/2220-7619-ISI-1334

Citation:

Grigorieva S.A., Kosyreva A.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B.,
Bakshtanovskaya I.V., Kalgina G.A., Kurlaeva L.V. Immune system parameters
in chronic opisthorchiasis patients related to genes polymorphisms
associated with developing ischemic heart disease // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1,
pp. 177–183. doi: 10.15789/2220-7619-ISI-1334

системы к «нормальному» уровню при наличии хронической паразитарной инвазии не всегда можно интерпретировать как «протективный» эффект того или иного полиморфизма. Наибольшие изменения в иммунном реагировании у пациентов с хроническим описторхозом выявлены при наличии полиморфизма в гене индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа. Полученные результаты позволяют предполагать участие исследованных генетических полиморфизмов в предрасположенности к проявлению определенных клинических форм заболевания при заражении возбудителем описторхоза.

Ключевые слова: генетические полиморфизмы, хронический описторхоз, иммунный статус, T-лимфоциты, B-лимфоциты, иммуноглобулины.

IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN CHRONIC OPISTHORCHIASIS PATIENTS RELATED TO GENES POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH DEVELOPING ISCHEMIC HEART DISEASE

Grigorieva S.A., Kosyreva A.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B., Bakshtanovskaya I.V., Kalgina G.A., Kurlaeva L.V.

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to identify a relationship between gene polymorphisms associated with developing coronary heart disease and pathogenetic features of opisthorchiasis invasion. There were compared laboratory parameters assessing the immune system functioning (lymphocyte immunophenotyping evaluated by flow cytometry, serum immunoglobulin and cytokine concentrations, non-specific resistance indices) in patients with chronic opisthorchiasis (caused by *Opisthorchis felineus*) of various genotypes with/without mutations in loci associated with predisposition to developing coronary heart disease. It was found that opisthorchiasis invasion leads to altered immune response in patients bearing mutations in genes encoding adenosine monophosphate deaminase 1, hypoxia induced factor 1 alpha, and apolipoprotein E affecting relevant protein functions compared to those without minor alleles. Upon that, patients carrying mutation in the adenosine monophosphate deaminase 1 gene, turned out to have lowered cellular (decreased count of cytotoxic lymphocytes) and humoral immunity (decreased immunoglobulin A level). Patients with opisthorchiasis bearing a rare allele in the hypoxia-induced factor 1 alpha gene were featured with activated adaptive immunity and reduced activation of innate immunity. Moreover, mutated apolipoprotein E gene was coupled to decreased activity of cellular immune response, which exacerbates the course of opisthorchiasis invasion, whereas minor allele of the rs1333049 polymorphism in the cyclin-dependent kinase inhibitor gene results in no significantly altered immune response. Thus, gene-related dysfunction of certain proteins may allow opisthorchiasis invasion to elicit multidirectional changes in immune response, so that approaching the normal range of diverse immune-related parameters during chronic parasitic invasion may not necessarily be interpreted as a “protective” effect exerted by any of gene polymorphisms. The most prominent changes in immune response of patients with chronic opisthorchiasis were detected in case of polymorphism in the factor-induced hypoxia-1 alpha gene. The data obtained suggest that the aforementioned genetic polymorphisms may predispose to manifestation of certain opisthorchiasis clinical forms.

Key words: genes polymorphisms, chronic opisthorchiasis, immune status, T-lymphocytes, B-lymphocytes, immunoglobulins.

Введение

Тюменская область расположена на территории гиперэндемического Обь-Иртышского очага описторхоза и входит в число субъектов, в которых уровень заболеваемости населения описторхозом превышает средние федеральные показатели в 10 и более раз. Как следствие, приоритетность описторхозной инвазии не теряет своей актуальности уже более 80 лет. Формирование патологического процесса при инвазии обусловлено комплексом факторов: формирование дисбаланса иммунной системы и аутоиммунных процессов, изменение эндокринной регуляции иммуногенеза, развитие дисбактериозов и активизация оппортунистических инфекций, нарушение функции печени и желчевыводящих путей [11]. Многолетние исследования сотрудников нашего института позволили подробно описать иммунные реакции

и на разных стадиях описторхозной инвазии, и в динамике терапии. Выявлены следующие особенности иммунного реагирования при хронической описторхозной инвазии [2]:

- активация неспецифической резистентности (повышение значений кислородзависимой бактерицидности, миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов, повышение концентрации IL-8);
 - усиление хелперного влияния и активация гуморального звена иммунитета — повышение концентрации общих IgA, IgM и IgE, повышение концентрации циркулирующих иммунных комплексов;
 - снижение показателей адаптивного клеточного иммунитета [сниженное количество цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺)].
- Влияние на иммунный ответ могут оказывать индивидуальные особенности организма, в том числе зависящие от полиморфизма ге-

нов. Определение частоты встречаемости аллелей полиморфных генов, ассоциированных с метаболическими нарушениями у больных хроническим описторхозом, и обнаружение их влияния на показатели иммунной системы может способствовать выявлению маркеров предрасположенности к реализации определенной клинической формы заболевания при заражении возбудителем описторхоза.

Целью исследования было выявление взаимосвязи между полиморфизмами, ассоциированными с развитием ишемической болезни сердца, и патогенетическими особенностями описторхозной инвазии. Мы сопоставляли иммунологические показатели в подгруппах больных хроническим описторхозом с наличием и отсутствием мутаций в локусах, связанных с предрасположенностью к развитию ишемической болезни сердца.

Материалы и методы

Проведено обследование 19 пациентов с диагнозом «описторхоз, хроническая фаза» (ХО), средний возраст пациентов составил $50,4 \pm 2,6$. У пациентов определяли широкий спектр иммунологических показателей. Исследование фенотипа лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченых FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X) и PC5 (phycoerythrin-cyanin 5). Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLys C Lysis Solution. Окраску антителами и лизирование проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Анализировали окрашенные клетки на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США). Использовалось трехцветное иммунофенотипирование по панелям: CD3/CD4/CD45, CD3/CD8/CD45, CD3/CD16⁺56/CD45 и CD3/CD19/CD45. Основные фенотипы лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻CD16/56⁻CD45⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD45⁺), Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), NK-клетки (CD3⁻CD16/56⁺CD45⁺), В-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺CD45⁺). Абсолютные значения были получены по двухплатформенной технологии с использованием результатов гематологического анализа. Концентрацию иммуноглобулинов А, М, G и Е в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, США) с помощью коммерческих наборов «Имуноскрин-G, М, А-ИФА-БЕСТ» и «IgE-общий-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). Концентрацию цитокинов (IFN γ ,

IL-4, IL-8, IL-10) определяли иммуноферментным методом (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, США) с помощью коммерческих наборов «Гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). Неспецифическая резистентность определялась по поглотительной способности нейтрофилов, которую оценивали в тесте с частицами латекса (d 1 мкм) (ООО «Диаэм», Москва). Анализу подвергались 200 нейтрофилов, после чего вычисляли процент нейтрофилов, имеющих поглощенные частицы [7]. Метаболическую активность нейтрофилов определяли цитохимическим методом восстановления нитросинего тетразолия (ООО «Диаэм», Москва) до диформаза. О степени активности нейтрофилов судили по количеству захваченного формаза. Спонтанный НСТ-тест отражал степень функционального раздражения нейтрофилов *in vitro*, стимулированный вариант (10% раствор пирогенала) характеризовал функциональный резерв [7]. Определение активности фермента миелопероксидазы нейтрофилов проводили спектрофотометрическим методом [14]. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли методом преципитации раствором ПЭГ-6000, с оценкой результата на спектрофотометре [9]. Выделение тотальной ДНК человека из образцов крови проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Генетические полиморфизмы выявляли методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа PyroMark24 и коммерческих наборов реагентов (АмплиСенс Пироскрин «ИБС-СКРИН»), предназначенных для оценки генетической предрасположенности к развитию ишемической болезни сердца путем обнаружения полиморфизмов в локусах:

- rs17602729 гена AMPD1 (аденозинмонофосфатдезаминаза 1);
- rs1333049 гена CDKN 2A/2B (ингибиторы циклин-зависимой киназы);
- rs11549465 гена HIF1A (фактор, индуцируемый гипоксией, 1 альфа);
- rs3025056 гена MMP3 (матриксная металлопептидаза 3);
- rs42935 и rs7412 гена APOE (аполипопротеин E).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием приложений Microsoft Excel 2007. Достоверность различий между показателями выборок в подгруппах больных с наличием или отсутствием мутаций оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Среди обследованных выявленные частоты встречаемости минорных аллелей по исследованным полиморфизмам в целом соответствуют литературным данным (поиск проводили на ресурсе <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs> по номеру полиморфизма).

Ген *AMPD1* кодирует аденозинмонофосфат-дезаминазу 1, специфичный для скелетных мышц белок, участвующий в регуляции энергетических процессов. Он катализирует дезаминирование аденозинмонофосфата до инозина монофосфата и играет важную роль в цикле пуриновых нуклеотидов. При нарушении функции дезаминазы увеличивается концентрация аденозина, оказывающего кардиопротекторный эффект при ишемии. Аденозин уменьшает продукцию свободных радикалов нейтрофилами [4].

Обследование пациентов с ХО выявило различия в иммунном реагировании в зависимости от полиморфизма гена *AMPD1*. У носителей редкого аллеля по сравнению с носителями частого аллеля выше относительное количество $CD3^+CD4^+$ -лимфоцитов ($50,2 \pm 1,8$ и $42,3 \pm 2,5$; $p < 0,01$) и ниже относительное количество ($20,6 \pm 1,7$ против $29,6 \pm 3,2$; $p < 0,02$) $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов,

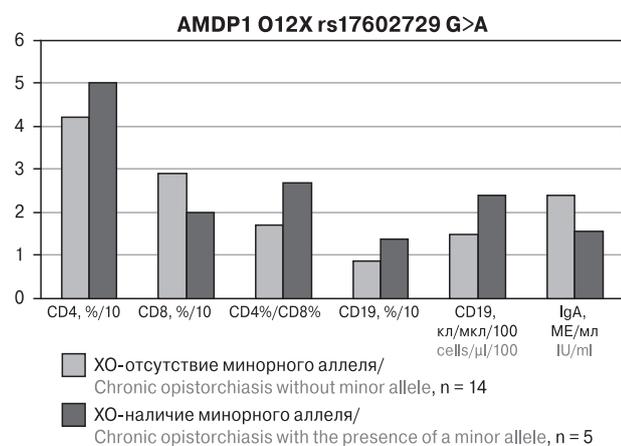


Рисунок 1. Иммунологические показатели у пациентов с хроническим описторхозом в зависимости от наличия или отсутствия минорного аллеля гена аденозинмонофосфат-дезаминазы 1 (AMPD1)

Figure 1. Immunological indicators in patients with chronic opisthorchiasis depending on the presence or absence of a minor allele of the adenosine monophosphate desaminase 1 gene (AMPD1)

Примечание. Для CD4, CD8, CD19 (%) приведены значения, деленные на 10, а для CD19 (кл/мкл) значение, деленное на 100 для соразмерности масштаба измерения.

Note. For CD4, CD8, CD19 (%) the values are divided by 10, and for CD19 (cells/μl) the value is divided by 100 for the proportionality of the measurement scale.

в результате в этой группе пациентов выше индекс Т-хелперы/Т-цитотоксические (Тх/Тцит) ($2,7 \pm 0,3$ и $1,7 \pm 0,2$; $p < 0,01$). Количество В-лимфоцитов у пациентов с минорным аллелем выше: относительное $13,6 \pm 1,3$ и $8,6 \pm 1,3$ ($p < 0,01$), абсолютное $238,4 \pm 29,6$ и $148,6 \pm 21,1$ кл/мкл ($p < 0,02$), в то же время концентрация иммуноглобулина А в периферической крови ниже ($1,56 \pm 0,26$ и $2,38 \pm 0,29$; $p < 0,05$). По мнению ряда авторов [12, 13], пуриновые нуклеозиды (аденозин, инозин) и нуклеотиды (аденозинмонофосфат и инозинмонофосфат) принимают непосредственное участие в метаболизме лимфоцитов, их созревании и имеют прямое отношение к иммунорегуляторным процессам в организме. Увеличение содержания аденозина и аденозинмонофосфата (может наблюдаться при снижении функциональной активности *AMPD1* при наличии редкого аллеля), сопровождается увеличением общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, снижением количества Т-супрессоров, числа Т-лимфоцитов, концентрации IgA. При введении аденозина имеет место усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета. Полученные нами результаты иммунологического обследования больных ХО с наличием и отсутствием мутации гена аденозинмонофосфат-дезаминазы 1 демонстрируют у пациентов, имеющих мутацию, меньшую выраженность адаптивного клеточного (сниженное количество $CD8^+$ -лимфоцитов), адаптивного гуморального иммунитета (сниженное количество IgA) (рис. 1).

Ингибиторы циклин-зависимых киназ (ген *CDKN 2A/2B*) играют ключевую роль в регуляции клеточного цикла нетрансформированных клеток и вовлечены в подавление пролиферации клеток в условиях стресса, вызванного нехваткой ростовых факторов, повреждением ДНК, тепловым шоком, действием тяжелых металлов или антипролиферативных цитокинов [10]. Результатом гиперэкспрессии генов *CDKN 2A/2B* являются эндокринезависимая активация клеточного цикла и пролиферация клеток [1]. В работе Назаренко Г.И. [8] у носителей мутации в локусе rs1333049 была выявлена статистически значимая связь с ишемической болезнью сердца.

В наших исследованиях у пациентов с ХО не выявлено статистически значимых различий в иммунном реагировании в зависимости от наличия или отсутствия мутации в локусе rs1333049.

Ген *HIF1A* кодирует фактор, индуцируемый гипоксией, 1 альфа, который считается ведущим транскрипционным регулятором генов млекопитающих, ответственных за реакцию на недостаток кислорода. Он активируется в физиологически важных пунктах регуляции кислородных путей, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс,

включает гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз [5].

В наших исследованиях у пациентов с ХО, имеющих редкий аллель гена индуцируемого гипоксией фактора, относительное количество (51,8±3,8 против 62,6±1,9; $p < 0,02$) и абсолютное содержание (2731±404 и 3927±360 кл/мкл; $p < 0,05$) нейтрофильных гранулоцитов снижено. Повышено относительное количество (39,0±3,6 против 28,2±1,6; $p < 0,01$) и абсолютное содержание (1941±103 и 1678±83 кл/мкл; $p < 0,05$) лимфоцитов; абсолютное количество Т-лимфоцитов (1543±134 и 1231±59 кл/мкл; $p < 0,05$). Повышено относительное (50±1,6 против 43±2,5 $p < 0,02$) и абсолютное (970±68 и 715±53; $p < 0,01$) количество CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. Известно [16], что активация HIF1A сопряжена с переходом клетки на гликолитический, анаэробный тип метаболизма. Это характерно для условно провоспалительных популяций клеток: M1-макрофагов, нейтрофилов, Th1, Th2, Th17, CD8⁺ Т-лимфоцитов — так как помимо гликолитического типа метаболизма в этих клетках экспрессируются многие факторы агрессии и костимуляторные молекулы. Наличие минорного аллеля Т снижает экспрессию индуцируемого гипоксией фактора HIF1A [3]. Таким образом, у пациентов с редким аллелем гена HIF1A можно было ожидать снижение активации факторов неспецифической резистентности и специфического клеточного иммунитета. В наших исследованиях показатели иммунного реагирования у больных ХО, имеющих редкий аллель гена HIF1A, демонстрируют активацию адаптивного иммунитета и снижение активации врожденного иммунитета (рис. 2).

Ген APOE кодирует аполипопротеин E (APOE). APOE — фермент, играющий важную роль в метаболизме липидов. Основная функция APOE — участие в транспортировке холестерина к тканям от мест его синтеза или всасывания в составе липопротеинов. Аминокислотные замены влияют на структуру APOE, его стабильность и родство с рецепторами. В результате меняется функционирование этого белка. Аполипопротеин E и APOE-содержащие липопротеины могут подавлять клеточный иммунитет, оказывая антипролиферативное действие на митоген-стимулированные лимфоциты [15].

В наших исследованиях у носителей минорного аллеля С (rs429358) показатель относительного количества Т-цитотоксических лимфоцитов достоверно ниже (20,5±3,1 против 29,1±3,0; $p < 0,05$), за счет этого выше иммунорегуляторный индекс (2,7±0,4 против 1,8±0,2; $p < 0,02$). У пациентов с ХО, имеющих редкий аллель гена APOE, выше относительное коли-

чество В-лимфоцитов (15,5±1,9 против 8,5±1,1; $p < 0,001$) и выше их абсолютное количество (270±41 против 146±17; $p < 0,001$). Согласно данным последних лет [6], APOE подавляет воспалительную активацию фагоцитов. Экспрессия APOE снижает поляризацию макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа M1, характеризуемого продукцией цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α , и повышает их поляризацию в сторону противовоспалительного фенотипа M2, характеризуемого продукцией цитокинов IL-4, IL-10. В наших исследованиях не выявлено различий между группами с наличием или отсутствием мутантного аллеля в реакциях врожденного иммунитета. Обнаружено, что наличие мутации rs42935 гена APOE приводит к снижению активности адаптивного клеточного иммунного ответа, что усугубляет течение описторхозной инвазии у пациентов с мутацией гена APOE (рис. 3).

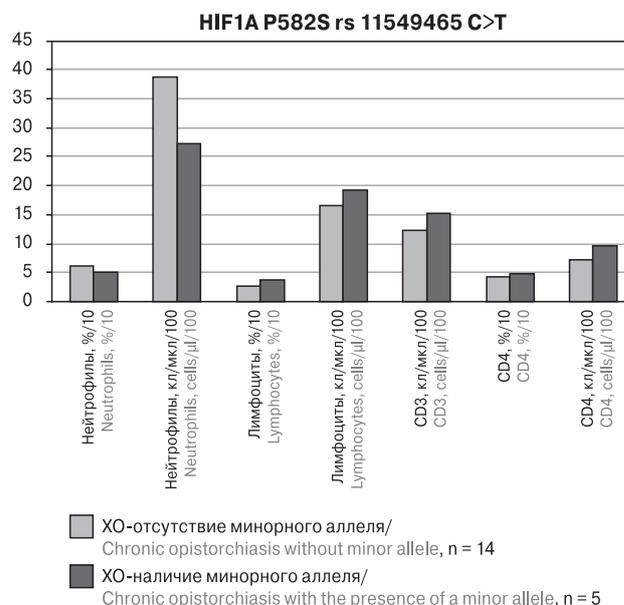


Рисунок 2. Иммунологические показатели у пациентов с хроническим описторхозом в зависимости от наличия или отсутствия минорного аллеля гена индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа (HIF1A)

Figure 2. Immunological indicators in patients with chronic opisthorchiasis depending on the presence or absence of a minor allele of the hypoxia-induced factor 1 alpha (HIF1A) gene

Примечание. Для абсолютных значений нейтрофилов, лимфоцитов и CD4 приведены показатели, деленные на 10; относительные значения тех же клеток, а также CD3 представлены деленными на 100 для соразмерности масштаба измерения.

Note. For neutrophils, lymphocytes, CD4 (%) the values are divided by 10, and for neutrophils, lymphocytes, CD4 and CD3 (cells/ μ l) the value is divided by 100 for the proportionality of the measurement scale.

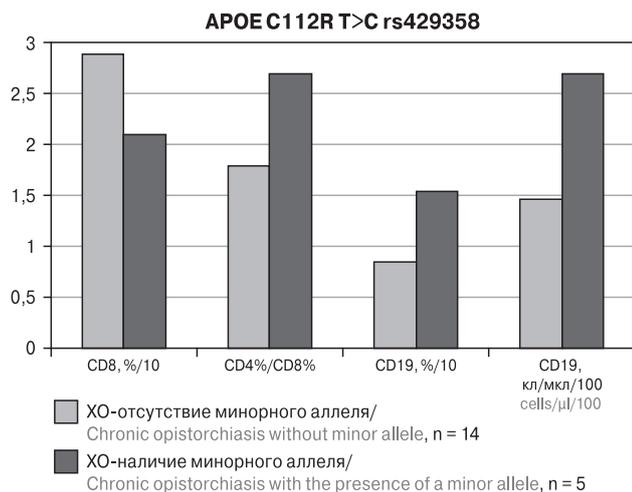


Рисунок 3. Иммунологические показатели у пациентов с хроническим описторхозом в зависимости от наличия или отсутствия минорного аллеля гена аполипопротеина E (АРОЕ)

Figure 3. Immunological indicators in patients with chronic opisthorchiasis depending on the presence or absence of a minor allele of the apolipoprotein E gene (APOE)

Примечание. Для CD8, CD19 (%) приведены значения, деленные на 10, а для CD19 (клетки/мкл) значение, деленное на 100 для соразмерности масштаба измерения.

Note. For CD8, CD19 (%) the values are divided by 10, and for CD19 (cells/ μ l) the value is divided by 100 for the proportionality of the measurement scale.

Заключение

Имеющиеся данные о патогенетическом значении генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболическими процессами, провоцирующими развитие ишемической болезни сердца, позволяют предполагать их вовлечение в иммунологические механизмы патогенеза описторхозной инвазии.

Обнаружено, что при обусловленных мутациями нарушениях функций определенных белков воздействие описторхозной инвазии приводит к различным отклонениям в иммунной реакции, у больных описторхозом выявлены разнонаправленные изменения показателей иммунного ответа, что, несомненно, влияет на течение болезни. При этом приближение показателей разных звеньев иммунной системы к «нормальному» уровню при наличии хронической паразитарной инвазии не всегда можно интерпретировать как «протективный» эффект того или иного полиморфизма. Наибольшие изменения в иммунном реагировании у пациентов с ХО выявлены при наличии полиморфизма в гене индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа.

Полученные результаты позволяют предполагать участие исследованных генетических полиморфизмов в предрасположенности к проявлению определенных клинических форм заболевания при заражении возбудителем описторхоза.

Список литературы/References

- Артамонова Е.В. Практические аспекты клинического применения нового класса препаратов — ингибиторов циклинзависимых киназ: эффективность и переносимость лечения // Опухоли женской репродуктивной системы. 2018. Т. 14, № 1. С. 52–60. [Artamonova E.V. Practical aspects of the clinical use of a new class of drugs — inhibitors of cyclin-dependent kinases: efficacy and tolerability of treatment. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of Female Reproductive System*, 2018, vol. 14, no. 1, pp. 52–60. (In Russ.)] doi: 10.17650/1994-4098-2018-14-1-52-60
- Кальгина Г.А., Степанова Т.Ф. Значение цитокинов в иммунитете при описторхозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2011. № 4. С. 49–54. [Kalgina G.A., Stepanova T.F. The value of cytokines in immunity with opisthorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2011, no. 4, pp. 49–54. (In Russ.)]
- Ковалева Е.В., Доронин Б.М., Морозов В.В., Серяпина Ю.В. Полиморфизм HIF1 α — диагностический маркер ишемического инсульта // Неврология и психиатрия. 2016. Т. 116, № 12, Вып. 2. С. 10–13. [Kovaleva E.V., Doronin B.M., Morozov V.V., Seryapina Yu.V. The HIF1 α polymorphism is a diagnostic marker of ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2016, vol. 116, no. 12, iss. 2, pp. 10–13. (In Russ.)] doi: 10.17116/jnevro201611612210-13
- Козловский В.И. Исследование механизмов действия аденозина, АДФ и АТФ в коронарном кровообращении трансгенных мышей с хроническим окислительным стрессом и сердечной недостаточностью // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2009. № 1. С. 59–61. [Kozlovsky V.I. Study of the mechanisms of action of adenosine, ADP and ATP in coronary circulation of transgenic mice with chronic oxidative stress and heart failure. *Zhurnal Grodnenskogo Gosudarstvennogo Medicinskogo Universiteta = Journal of Grodno State Medical University*, 2009, no. 1, pp. 59–61. (In Russ.)]
- Левченкова О.С., Новиков В.Е. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. № 2. С. 134–144. [Levchenkova O.S., Novikov V.E. Inducers of the regulatory factor to hypoxia adaptation. *Rossiyskiy mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*, 2014, no. 2, pp. 134–144. (In Russ.)]
- Малашенкова И.К., Крынский С.А., Мамошина М.В., Дидковский Н.А. Полиморфизм гена АРОЕ: влияние аллеля АРОЕ 4 на системное воспаление и его роль в патогенезе болезни Альцгеймера // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 3. С. 303–312. [Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Mamoshina M.V., Didkovskiy N.A. APOE gene polymorphism: the impact of APOE4 allele on systemic inflammation and its role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 3, pp. 303–312. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-303-312

7. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Основы иммунологии: лабораторный практикум. Ижевск: Удмуртский университет, 2001. 133 с. [Menshikov I.V., Beduleva L.V. Fundamentals of immunology: laboratory practice. Izhevsk: Udmurt University, 2001. 133 p. (In Russ.)]
8. Назаренко Г.И., Гушина Н.Н. Изучение ассоциации генов ингибитора циклинзависимой киназы CDKN2A/CDK2B RS10757274 и CDKN2A/CDK2B на 9321.3 хромосоме с риском развития ишемической болезни сердца // CardioСоматика. 2011. Прил. 1. С. 87. [Nazarenko G.I., Gushchina N.N. Studying of association of genes of inhibitor of a cyclin-dependent kinase CDKN2A/CDK2B RS10757274 and CDKN2A/CDK2B on 9Z21.3 a chromosome with risk of development of coronary heart disease. CardioSomatika, 2011, suppl. 1, p. 87. (In Russ.)]
9. Осипов С.Г., Еремеев В.В., Руднев В.И., Титов В.Н. Методы определения ЦИК (Обзор литературы) // Лабораторное дело. 1983. № 11. С. 1–7. [Osipov S.G., Eremeev V.V., Rudnev V.I., Titov V.N. Methods for determining the CEC (Literature review). Laboratornoe delo = Laboratory Medicine, 1983, no. 11, pp. 1–7. (In Russ.)]
10. Романов В.С., Пospelov В.А., Пospelova Т.В. Ингибиторы циклинзависимых киназ p21Wf1: современный взгляд на роль в клеточном старении и онкогенезе // Биохимия. 2012. Т. 77, Вып. 6. С. 701–712. [Romanov V.S., Pospelov V.A., Pospelova T.V. Inhibitors of cyclin-dependent kinases p21Wf1: a modern view of the role in cellular aging and oncogenesis. Biokhimiya = Biochemistry, 2012, vol. 77, no. 6, pp. 701–712. (In Russ.)]
11. Степанова Т.Ф. Описторхоз: новые взгляды на инвазионную болезнь, основы клинической реабилитации, методологию крупномасштабных оздоровительных работ. Тюмень: ТюмГУ, 2002. 196 с. [Stepanova T.F. Opisthorchiasis: new views on invasive disease, the basics of clinical rehabilitation, the methodology of large-scale recreational work. Tyumen: Tyumen State University, 2002. 196 p. (In Russ.)]
12. Тапбергенов С.О., Тапбергенов Т.С. Ферменты метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунный статус при стрессорных состояниях разного происхождения // Успехи современного естествознания. 2009. № 7. С. 92–93. [Tapbergenov S.O., Tapbergenov T.S. Enzymes of purine nucleotide metabolism and immune status in stress states of different origin. Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya = Successes of Modern Natural Science, 2009, no. 7, pp. 92–93. (In Russ.)]
13. Тапбергенов С.О., Советов Б.С., Тапбергенов А.Т., Ганн Э. Метаболические эффекты сочетанного введения комплекса аденозин и аденозинмонофосфат при гипераденаемии // Наука и здравоохранение. 2017. № 2. С. 92–103. [Tapbergenov S.O., Sovetov B.S., Tapbergenov A.T., Hahn E. Metabolic effects of combined integration of adenosine and adenosine monophosphat in hyperadenalemia. Nauka i zdavoookhranenie = Science and Healthcare, 2017, no. 2, pp. 92–104. (In Russ.)]
14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Методические рекомендации по оценке иммунного статуса человека. В кн.: Экологическая иммунология. М.: Изд-во ВНИРО, 1995. С. 126–127. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Istamov H.I. Methodical recommendations for evaluation of human immune status. In: Ecological Immunology. Moscow: Publishing house VNIRO, 1995. С. 126–127. (In Russ.)]
15. Pepe M.G., Curtiss L.K. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL- In. Immunology, 1986, vol. 136, no. 10, pp. 3716–3723.
16. Phan A.T., Goldrath A.W. Hypoxia-inducible factors regulate T cell metabolism and function. Mol. Immunol., vol. 68, iss. 2, pt. C, pp. 527–535.

Авторы:

Григорьева С.А., научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Косырева А.А., младший научный сотрудник группы молекулярно-генетических и паразитологических исследований ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова К.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Бакштановская И.В., к.б.н., ученый секретарь ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Кальгина Г.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Курлаева Л.В., младший научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Grigorieva S.A., Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kosyreva A.A., Junior Researcher, Molecular Genetic and Parasitological Research Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova T.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova K.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinics and Immunology of Biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Bakshtanovskaya I.V., PhD (Biology), Scientific Secretary, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kalgina G.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kurlaeva L.V., Junior Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.11.2019
Отправлена на доработку 16.01.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 30.11.2019
Revision received 16.01.2020
Accepted 11.03.2020

КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Е.А. Зайцева¹, В.Н. Лучанинова², Е.А. Мельникова³, Т.С. Коменкова¹, Е.В. Крукович¹

¹ ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГБОУ ВО Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУЗ Краевая детская клиническая больница № 1, г. Владивосток, Россия

Резюме. Инфекция мочевой системы (ИМС) является актуальной проблемой современной педиатрии, педиатрической нефрологии и урологии. Клиническая картина ИМС у детей полиморфна, может быть достаточно стертой и меняться с возрастом. Классические симптомы инфекции мочевой системы у новорожденных и детей раннего возраста нередко протекают субклинически. Среди многочисленных факторов в развитии ИМС приоритетное значение имеют биологические свойства микроорганизмов, колонизирующих почечную ткань. В последние годы увеличилось этиологическое значение *Enterococcus faecalis* в развитии данной патологии. Цель исследования — определить клинические признаки ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, у детей и выявить его биологические особенности для оценки их клинической значимости. **Материалы и методы.** Проведен анализ этиологической структуры ИМС у детей в многопрофильной детской клинической больнице за 9 лет, представлены результаты клинико-лабораторного обследования 181 ребенка с ИМС от 3 дней до 17 лет, из мочи которых был выделен *E. faecalis*, результаты микробиологического исследования 60 штаммов *E. faecalis*, выделенных из мочи исследуемых детей. **Результаты.** Представлена клинико-лабораторная характеристика ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, возрастная вариабельность симптомов. Преобладающими в клинической картине являются интоксикационный синдром и лихорадка. Ключевым признаком ИМС является дисфункция желудочно-кишечного тракта (у новорожденных и детей первого года жизни) и боль в поясничной области (у детей старшего возраста). Выявленные клинические симптомы могут быть связаны с поражением верхних отделов мочевыводящих путей, наличием сопутствующих заболеваний и с патогенными свойствами *E. faecalis*. Другие симптомы встречались реже, соответствовали возрасту пациентов, хотя абдоминалгия одинаково часто встречалась у детей всех возрастных групп. Результаты лабораторного обследования также зависели от возраста пациентов. Отмечено, что лейкоцитоз, тромбоцитоз более выражены у новорожденных детей; лейкоцитурия и протеинурия — у детей старше года, хотя в этой группе клинические симптомы менее выражены. Указаны особенности и клиническая значимость биологических свойств *E. faecalis*, их неоднородность с учетом возраста пациентов, от которых они выделены. Выявлена связь патогенных свойств между собой и определенными клиническими симптомами. **Заключение.** Доминирующие

Адрес для переписки:

Зайцева Елена Александровна
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, ФГБОУ ВО
Тихоокеанский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (902) 524-57-20 (моб).
E-mail: elza200707@mail.ru

Contacts:

Elena A. Zaitseva
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakova pr., 2,
Pacific State Medical University.
Phone: +7 (902) 524-57-20 (mob.).
E-mail: elza200707@mail.ru

Для цитирования:

Зайцева Е.А., Лучанинова В.Н., Мельникова Е.А., Коменкова Т.С., Крукович Е.В. Клинико-микробиологические аспекты инфекции мочевой системы, ассоциированной с *Enterococcus faecalis* // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 184–190. doi: 10.15789/2220-7619-CAM-1341

Citation:

Zaitseva E.A., Luchaninova V.N., Melnikova E.A., Komenkova T.S., Krukovich E.V. Clinical and microbiological aspects of *Enterococcus faecalis*-associated urinary tract infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 184–190. doi: 10.15789/2220-7619-CAM-1341

Исследование выполнено при финансовой поддержке внутривузовских грантов (Приказ №105-ОД от 25.03.2015; № 61-ОД от 11.03.2016), РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90036.

клинические симптомы (интоксикация, гипертермия), свидетельствующие о поражении верхних отделов мочевыделительной системы, связаны, в том числе, с комплексом биологических свойств *E. faecalis*, обладающих гистоповреждающим и цитолитическим действием.

Ключевые слова: инфекция мочевой системы, дети, *E. faecalis*, биологические свойства, лабораторные показатели, клинические симптомы.

CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS*-ASSOCIATED URINARY TRACT INFECTION

Zaitseva E.A.^a, Luchaninova V.N.^b, Melnikova E.A.^c, Komenkova T.S.^a, Krukovich E.V.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

^b Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Regional Children's Clinical Hospital No. 1, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Urinary tract infections (UTIs) pose a topical problem in current pediatrics, pediatric nephrology and urology. UTI-related clinical picture in childhood is polymorphic, sometimes being rather subtle and undergoing age-related alterations. Often, typical UTI symptoms in infants and early children occur subclinically. Microbe-related properties colonizing renal tissues dominate among multiple factors involved in developing UTI. In recent years, etiological importance of *Enterococcus faecalis* in development of such pathology has been increased. Our study was aimed to determine *E. faecalis*-associated UTI clinical signs in children and unveil their biological characteristics to assess related clinical significance. **Materials and methods.** A nine-year pediatric UTI etiological pattern was analyzed at the multi-field pediatric clinical hospital. The data of clinical and laboratory examination of 181 UTI children aged 3 days — 17 years as well as microbiological study of 60 *E. faecalis* strains isolated from patient urine were obtained. **Results.** Clinical and laboratory characteristics of *E. faecalis*-associated UTIs, age-related symptom variability were presented. Intoxication syndrome and fever dominated in the clinical picture. A key sign of UTIs was gastrointestinal dysfunction (in neonates and one-year old children) and pain in the lumbar region (in older children). The identified clinical symptoms may be associated with the upper urinary tract damage, concomitant diseases, and the pathogenic properties of *E. faecalis*. Other symptoms were less common, consistent with the age of the patients, although abdominalgia was equally common for children in all age groups. Data of laboratory examination also depended on patient age. It was noted that leukocytosis and thrombocytosis were more prominent in neonates, whereas leukocyturia and proteinuria — in children above one year of age, although clinical symptoms in this group were less overt. Specific features and clinical significance of *E. faecalis*-related biological properties, their heterogeneity related to patient age were noted. An inter-connected relationship between pathogenic properties and certain clinical symptoms was revealed. **Conclusion.** The dominant clinical symptoms (intoxication, hyperthermia), indicative of damaged upper urinary system is related, among other things, to the set of *E. faecalis* biological properties exerting tissue-damaging and cytolytic effects.

Key words: urinary tract infection, children, *E. faecalis*, biological properties, laboratory parameter, clinical symptoms.

Введение

По данным научной литературы, изменилась этиологическая структура инфекции мочевой системы (ИМС) у детей. Многие авторы [2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12] доказывают этиологическое значение *Enterococcus faecalis* с удельным весом его в структуре ИМС от 5 до 75%. В связи с этим в настоящее время подвергается серьезной переоценке клиническое значение энтерококков, ранее считавшихся индифферентными сапрофитами [1].

Приоритетное значение в развитии ИМС среди многочисленных факторов имеют биологические свойства микроорганизмов, колонизирующих почечную ткань, так как ИМС — это результат бактериально-гостальных взаимоотношений, зависящих как от биоагрессивного потенциала (уропатогенности) инфекционных агентов, так и от состояния макроорганизма [2, 4].

Вовремя установленный точный диагноз ИМС и адекватное своевременное этиологическое лечение у детей с учетом преобладающих уропатогенов в каждой возрастной группе предотвращают распространение инфекции, рубцевание почек, снижают риск прогрессирования заболевания и развитие хронической почечной недостаточности [6, 11, 15].

Цель исследования — определить клинические признаки инфекции мочевой системы ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, у детей и выявить его биологические особенности для оценки их клинической значимости.

Материалы и методы

Исследование было одобрено Междисциплинарным комитетом по этике Тихоокеанского государственного медицинского университета (Протокол № 4 от 26 декабря 2016 г. и Протокол

№ 3 от 20 ноября 2017 г.). Информированное согласие на участие в исследовании было получено от родителей детей или их законных опекунов.

На первом этапе работы проанализировано 6438 бактериологических исследований образцов мочи, полученных от пациентов с ИМС в возрасте от 3 дней до 17 лет за 2007–2015 гг., установлена структура уропатогенов [8].

На втором этапе исследования для оценки клинических симптомов ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, и определения связи с его биологическими свойствами проводилось клиническое наблюдение за 181 пациентом с ИМС, находившихся на лечении в многопрофильной краевой детской больнице, из мочи которых был выделен *E. faecalis*, а также анализ их медицинской документации (форма № 003/у) с изучением результатов лабораторного и инструментального обследования (УЗИ). Сравнительный анализ интоксикационного синдрома проводился с помощью модифицированной формулы определения лейкоцитарного индекса эндогенной интоксикации (ЛИИ) [7]. Размер выборки предварительно не рассчитывался, выборка сплошная. Исследуемые пациенты были разделены на группы: 1 группа (новорожденные) — 85 человек (46,9%), из них девочек — 58, мальчиков — 27; 2 группа (с 29 дней до 1 года) — 65 человек (35,9%), из них девочек — 44, мальчиков — 21; 3 группа (старше 1 года) — 31 человек (17,2%), из них мальчиков — 12, девочек — 19.

Лабораторный этап включал микробиологическое исследование 60 культур *E. faecalis*, выделенных из мочи исследуемых детей с ИМС. Для проведения бактериологического исследования забирали среднюю порцию утренней мочи после гигиенического туалета наружных половых органов (иногда использовали мочеприемник). Мочу доставляли в лабораторию в течение 1 часа. Степень бактериурии определялась методом секторных посевов. Морфологические, культуральные и биохимические исследования выделенных культур *E. faecalis* проводили по общепринятым методам. Определение адгезивной активности *E. faecalis* проводили по методу В.И. Брилис и соавт. (1986 г.). Адгезивные свойства энтерококка оценивали с помощью следующих показателей: 1) среднего показателя адгезии (СПА) — среднего количества микробных клеток, прикрепившихся к одному эритроциту при подсчете не менее 100 эритроцитов, учитывая не более 5 эритроцитов в одном поле зрения; 2) индекса адгезивности микроорганизма (ИАМ) — среднего количества микробных клеток на одном участвующем в адгезии эритроците.

Полученные данные обрабатывались с применением метода параметрического анализа. Из показателей описательной статистики рас-

считывались относительные значения (Р, в %), их ошибки (mp%). Для оценки степени взаимосвязи проводился корреляционный анализ Пирсона (R) с расчетом коэффициента корреляции (r) и достоверности корреляции (p). При статистической обработке полученных материалов использован пакет прикладных программ Statistica 10.0 в операционной среде Windows 2010.

Результаты

По данным мониторинга этиологической структуры ИМС у детей в многопрофильной краевой детской больнице за 9 лет установлено, что *E. faecalis* являлся вторым по значимости (после кишечной палочки) уропатогеном с удельным весом от 16,14 до 32,48%. В то же время в отделениях новорожденных *E. faecalis* имел первостепенное значение в развитии ИМС, определяясь в 57,22% случаев. *E. faecalis* выделялся чаще весной, особенно в апреле, с большей частотой у новорожденных и пациентов 1 года жизни с ИМС, чем в других возрастных группах. При этом у девочек чаще в возрасте от 3 до 7 лет (66,4%), у мальчиков — в возрасте старше 15 лет (44,8%).

Среди всех клинических симптомов ИМС энтерококковой этиологии преобладали симптомы интоксикации (у 85,6±2,6% детей) разной степени выраженности. У новорожденных и детей раннего возраста к симптомам интоксикации нами отнесены плохая прибавка в массе тела, снижение аппетита, отказ от еды, бледность, мраморность кожных покровов. Повышение температуры тела, будучи одним из проявлений интоксикации, отмечалось у меньшего количества пациентов (51,9±3,7%), с преобладанием фебрильной лихорадки у 30,4±3,4% пациентов. Другие симптомы, характерные для ИМС у детей, были менее выражены. Так, болевой синдром отмечался у 23,8±3,2% пациентов. Причем дети чаще жаловались на боль в животе, чем в поясничной области, что связано с возрастным фактором. Поясничная боль в 29,0±8,1% случаев беспокоила пациентов только третьей группы. В этой же группе дизурические симптомы отмечались у 22,6±7,5% пациентов, то есть значительно чаще, чем у детей 1 и 2 групп (4,7 и 3,1% соответственно), у которых аналогом дизурии считалось беспокойство перед мочеиспусканием. В 15,4±2,9% случаев у детей 1 и 2 групп выявлены симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта, характерные для клинического течения пиелонефрита у детей раннего возраста (различия не достоверны, $p_{1-2} > 0,05$). Частота встречаемости симптомов в зависимости от возраста представлена на рис.

Показатели лабораторного и инструментального обследования детей с ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, зависели от нозологической формы ИМС, возраста пациентов и сопутствующих заболеваний. Анализ показателей красной крови выявил наличие анемии у 9 детей ($5,0 \pm 1,6\%$), из них — у 5 пациентов с хронической почечной недостаточностью. Средние показатели гемоглобина, эритроцитов в группах были в пределах нормы, наибольшие показатели отмечены в 1 группе, что соответствует возрастным особенностям. Тромбоцитоз (максимально до 1084×10^{12}) определялся у $14,9 \pm 2,6\%$ детей на фоне высокого лейкоцитоза. Во всех группах детей отмечены нормальные средние показатели тромбоцитов, уменьшающиеся с возрастом. Лейкоцитоз чаще выявлялся у пациентов 1 и 2 группы, в 3 группе средние значения лейкоцитов в периферической крови были в пределах нормы. Средние показатели удельного веса палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, моноцитов были в пределах нормы, не отличались у пациентов разного возраста.

Протеинурия от 0,033 до 1,98 г/л отмечалась у 40 пациентов, из них у 5 пациентов с ХПН. У 2 пациентов протеинурия была более 1 г/л. Максимальная протеинурия 1,98 г/л была у девочки в возрасте 1 месяц 21 день с острым пиелонефритом на фоне ОРВИ и сопровождалась анемией (гемоглобин — 84 г/л, эритроциты — $2,8 \times 10^{12}$), выраженными воспалительными изменениями в анализах мочи (лейкоцитурия сплошь, бактериурия 10^6 КОЕ в 1 мл), повышением экзогенности паренхимы почек при УЗИ. Наличие бактерий в общем анализе мочи, являясь специфичным маркером ИМС, выявлено только в $25,4 \pm 3,2\%$ случаев (у 46 пациентов). Лейкоцитурия от 5 до 200 клеток в поле зрения в общем анализе мочи была только у 128 ($70,7 \pm 3,4\%$) пациентов, в 1 мл мочи (от 2500 до 200 тыс.) — у $57,3\%$. Поэтому детям раннего возраста поставить диагноз ИМС только на основании общего анализа мочи невозможно. Гематурия встречалась реже — в общем анализе мочи у $32,0\%$ пациентов (максимально до 200 клеток в поле зрения), в анализе мочи по Нечипоренко — в $16,6 \pm 2,8\%$ случаев (чаще 2500–5000 клеток в 1 мл мочи). Бактериурия определена у всех пациентов, чаще всего в диагностическом титре 10^5 КОЕ и выше в 1 мл мочи.

Показатели рН мочи колебались от 5,0 до 8,0, но в основном реакция мочи была кислой (в $64,1\%$ случаев) и нейтральной (у $34,4\%$ детей), только у двух пациентов была щелочная моча. Средний показатель рН мочи — 6,4.

Патологические изменения почек при ультразвуковом обследовании отмечались у $75,1 \pm 3,2\%$ детей, из них у $15,5 \pm 2,7\%$ — признаки врожден-

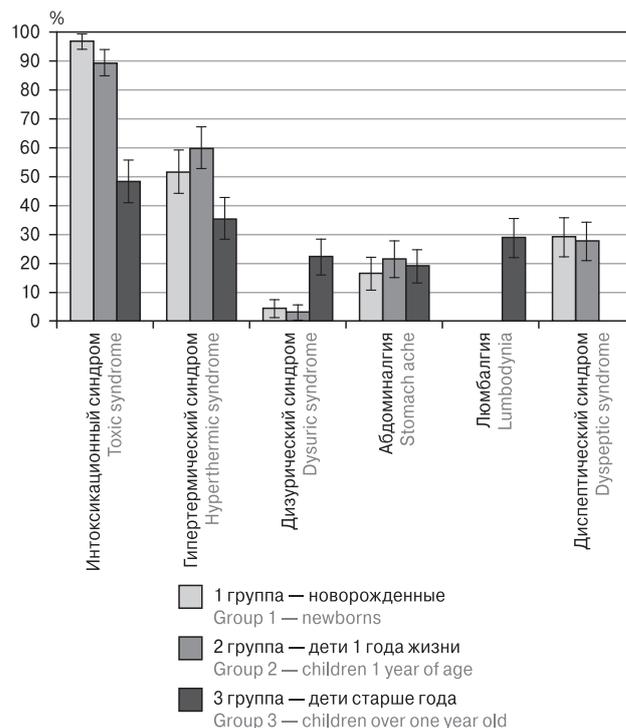


Рисунок. Частота встречаемости клинических симптомов ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, у детей

Figure. The frequency of UTI clinical symptoms associated with *E. faecalis* in children

ных пороков развития мочевыводящих путей, у $32,6 \pm 3,5\%$ — маркеры функциональных нарушений уродинамики, у остальных $27,0 \pm 3,3\%$ детей — признаки различных стадий воспалительного процесса.

В результате микробиологического исследования у всех изученных штаммов *E. faecalis*, выделенных из мочи детей с ИМС, определены типичные свойства — морфология, отсутствие подвижности, биохимическая активность в отношении маннита, рамнозы, метиленовой сини и вариабельность в отношении некоторых углеводов — глюкозы, лактозы, сахарозы. У большинства культур *E. faecalis* выявлена типичная для клинических изолятов ферментативная активность, связанная с патогенностью: гемолитическая (у $52,6\%$ культур), протеолитическая (у $82,9\%$ уропатогенных энтерококков, особенно в отношении ферментации молока — у $68,4\%$ культур), липолитическая (у $85,0\%$ исследуемых энтерококков), лецитиназная (у $27,3\%$ *E. faecalis*).

При изучении адгезивных свойств *E. faecalis*, изолированных из мочи у детей с ИМС, определено, что все культуры энтерококков обладали средним (СПА = 2,01–4,0; $57,1\%$ культур) или высоким (СПА $\geq 4,01$; $42,9\%$ *E. faecalis*) уровнем адгезии. Было установлено, что у *E. faecalis* со средним уровнем адгезии реже выявлялась лецитиназная (у $12,5\%$ исследуемых культур)

и протеолитическая (12,5% культур разжижали желатин) активности, на кровяном агаре отмечался гемолиз α -типа (35,7%). Энтерококки с высоким уровнем адгезии с большей частотой ферментировали желатин (50,0% культур) и молоко (91,7%), обладали лецитиназной (50,0%) и липазной (91,7%) активностями, показывали гемолиз β -типа (58,3%) [4].

Обсуждение

Клиническая картина ИМС у детей полиморфна, может быть достаточно стертой и меняться с возрастом. Классические симптомы, такие как интоксикация, дизурия, болевой и мочевого синдромы, у новорожденных и детей раннего возраста нередко протекают субклинически. Кроме того, инфекция мочевой системы в неонатальном периоде редко течет изолированно, и клиническая картина сопутствующей патологии часто является превалирующей, причем доминирующим является интоксикационный синдром [11]. В литературе отсутствует клиничко-лабораторная характеристика ИМС у детей, ассоциированной с *E. faecalis*, с учетом его биологических особенностей и лабораторных маркеров раннего выявления клинически значимых (уропатогенных) штаммов. В нашем исследовании преобладающий в клинической картине ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, интоксикационный синдром чаще проявлялся у новорожденных (96,9%), но клинически был более выражен у детей первого года жизни. Об этом свидетельствует самый высокий лейкоцитарный индекс эндогенной интоксикации — $10,8 \pm 3,27$ — и преобладание повышенной температуры тела в этой группе пациентов. Другие клинические симптомы соответствовали возрасту пациентов, хотя абдоминалгия одинаково часто отмечалась у детей всех возрастных групп. Ключевым признаком ИМС у новорожденных и детей первого года жизни является дисфункция желудочно-кишечного тракта, диагностированная у 29,4–27,7% пациентов (соответственно), а у детей старшего возраста — боль в поясничной области, отмеченная у трети детей. Выявленные клинические симптомы не являются специфичными для ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, согласуются с литературными данными [2, 6, 10, 11] и могут быть связаны с поражением верхних отделов мочевыводящих путей, наличием сопутствующих заболеваний и с патогенными свойствами энтерококка.

Отмеченная вариабельность результатов лабораторного обследования связана, в том числе, с возрастными анатомо-физиологическими особенностями мочевыделительной и иммунной систем [11]. Так, лейкоцитоз, тромбоцитоз были

более выражены у новорожденных детей и становились меньше с возрастом; значения лейкоцитурии (в поле зрения и в 1 мл) и протеинурии, наоборот, увеличивались с возрастом, и наибольшие отмечались у детей старше года, хотя в этой группе клинические симптомы менее выражены. Средние значения количества эритроцитов в общем анализе мочи больше у новорожденных, а в 1 мл мочи — у детей первого года жизни. У них же была менее выражена бактериурия.

Известно, что для инфекции мочевой системы характерна щелочная реакция мочи [6, 11, 14] за счет бактериального разложения азотсодержащих веществ мочи до аммиака. Выявлена особенность, которая может быть маркером ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, — кислая реакция инфицированной мочи, и, возможно, связана с биохимическими свойствами патогена. Энтерококки ферментируют разнообразные углеводы и спирты (сахарозу, лактозу, глицерин, салицин) в основном с образованием молочной кислоты, но не газа, снижая рН до 4,2–4,6 [1]. Полученные нами результаты лишь частично подтверждают исследования тайваньских ученых в этом направлении, свидетельствующие о том, что значения рН мочи связаны с определенным микроорганизмом [14].

Интересно, что вариабельность фенотипических проявлений биологических свойств энтерококков также была связана с возрастом пациентов, из мочи которых они были выделены. Например, мы отметили, что только у штаммов энтерококков, изолированных из мочи пациентов старше года, в 100% определялась ферментация глюкозы и низкая ферментативная активность в отношении лактозы. У энтерококков, выделенных из мочи пациентов грудного возраста, были менее выражены редуцирующие свойства в отношении трифенилтетразолия хлорида. У *E. faecalis*, выделенных из мочи новорожденных детей, чаще выявлялась капсула, протеолитическая и липолитическая (по отношению к твину 60) активности. У энтерококков, изолированных от детей первого года жизни, чаще определялась гемолитическая активность. У *E. faecalis*, выделенных у пациентов старше года, чаще выявлялась липолитическая активность (в отношении к твину 80). Подобных данных в доступной литературе не встретили.

В проведенном исследовании нами была выявлена связь между фенотипическим проявлением биологических свойств *E. faecalis*, обладающих цитолитическим и гистоповреждающим действием, и клиническими симптомами ИМС, характерными для поражения верхних отделов мочевыделительной системы. Прямая связь установлена между липолитической активностью *E. faecalis* (по отношению к твину 60) и наличием определенных клинических симптомов

пиелонефрита, характерных для детей раннего возраста (гипотрофии: $r = 0,32$, $p = 0,0465$; дисфункции желудочно-кишечного тракта: $r = 0,32$, $p = 0,0465$), между лецитиназной активностью *E. faecalis* с палочкоядерным сдвигом в клиническом анализе крови ($r = 0,34$, $p = 0,0360$) и лейкоцитарном индексом эндогенной интоксикации ($r = 0,28$, $p = 0,0183$), между протеолитической активностью фекальных энтерококков (ферментацией молока) и симптомами интоксикации ($r = 0,36$, $p = 0,028$), а также обратная корреляция с маркерами поражения почечной паренхимы (протеинурией: $r = 0,36$, $p = 0,028$). Установленная прямая корреляция между наличием α -гемолиза у *E. faecalis* и эхопризнаками уплотнения стенок чашечно-лоханочной системы ($r = 0,41$, $p = 0,009$), β -гемолиза с ЛИИ ($r = 0,33$, $p = 0,03$) и гипостенурией ($r = 0,37$, $p = 0,03$) подтверждает литературные данные о том, что продукция цитолитических ферментов, в том числе гемолизина, у клинических изолятов энтерококков ассоциируется с усилением тяжести инфекционного процесса [2]. Выявленная достоверная прямая связь биологических свойств изучаемого уропатогена (гемолитической активности β -типа с гидролизом желатины ($r = 0,58$, $p = 0,0001$) и лецитиназной активностью ($r = 0,52$, $p = 0,0004$), между степенью адгезии и гемолитической (β -гемолиз: $r = 0,61$, $p = 0,0$), лецитиназной ($r = 0,43$, $p = 0,0072$), желатиназной ($r = 0,6$, $p = 0,0001$) активностями подтверждает сочетанное действие этих патогенных факторов в развитии инфекционно-воспалительного процесса.

Нами впервые установлена связь между индексом адгезивности микроба (ИАМ) с результатами лабораторного и инструментального обследования детей с ИМС: уровнем палочкоядерных нейтрофилов ($r = 0,78$, $p = 0,0$) и пиелоектазией ($r = 0,46$, $p = 0,0035$), что подтверждает важную роль *E. faecalis* с выраженной адгезивной способностью в восходящем инфицирова-

нии тубулярного аппарата и чашечно-лоханочной системы почек [2].

Таким образом, клинические симптомы, показатели лабораторного и инструментального обследования у детей с ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, в основном не специфичны, связаны с возрастом пациентов, биологическими свойствами уропатогена, обладающим цитолитическим и гистоповреждающим действием в сочетании со средней или высокой адгезивной активностью. Доминирующим является интоксикационный синдром, который чаще проявляется у новорожденных, но клинически (с преобладанием лихорадки) более выражен у детей первого года жизни. В то же время полученные нами результаты показывают, что индикаторами предположительного диагноза ИМС, ассоциированной с *E. faecalis*, на этапе идентификации микроорганизма являются ранний возраст пациентов (новорожденные и дети первого года жизни), кислая рН мочи. В таких случаях, возможно, следует отказаться от применения широко используемых в стартовой терапии ИМС цефалоспоринов 2–3 поколения, к которым энтерококки резистентны.

Уропатогенные *E. faecalis* обладают комплексом биологических свойств, способных реализовать основные этапы патогенеза ИМС, что подтверждает их важное этиологическое значение и исключает случайную контаминацию. Совокупность выявленных патогенных свойств может быть маркером клинически значимых *E. faecalis*, позволяющим дифференцировать их от представителей нормальной микрофлоры человека. По результатам нашего исследования впервые определена связь факторов патогенности, адгезивной активности *E. faecalis* между собой, с клинико-лабораторными симптомами ИМС и возрастом пациентов, что требует в дальнейшем более глубокого изучения и может служить шаблоном прогностического течения ИМС.

Список литературы/References

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков. Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук. Ин-т клеточного и внутриклеточного симбиоза, 2012. 222 с. [Bukharin O.V., Valyshev A.V. Biology and ecology of enterococci. *Ekaterinburg: Ural Branch of Russian Academy of Sciences. Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, 2012. 222 p. (In Russ.)*]
2. Вялкова А.А., Грищенко В.А. Инфекция мочевой системы у детей: современные аспекты этиологической диагностики и лечения // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2017. Т. 62, № 1. С. 99–108. [Vyalkova A.A., Gritsenko V.A. Urinary tract infection in children: current aspects of etiological diagnosis and treatment. *Rossiiskij vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics, 2017, vol. 62, no 1, pp. 99–108. (In Russ.)*] doi: 10.21508/1027-4065-2017-62-1-99-108
3. Загрубина А.Н., Калмыкова А.С., Муравьева В.Н. Мониторинг чувствительности возбудителей инфекции мочевой системы у детей первых пяти лет жизни г. Ставрополя // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2012. Т. 25, № 1. С. 29–32. [Zagrubina A.N., Kalmykova A.S., Muravyova V.N. Monitoring of antibiotic susceptibility of urinary system infective agents in younger children. *Meditinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Bulletin of the North Caucasus, 2012, vol. 25, no. 1, pp. 29–32. (In Russ.)*]
4. Зайцева Е.А., Куркович Е.В., Мельникова Е.А., Лучанинова В.Н., Коменкова Т.С., Вайсеро Н.С. Роль факторов патогенности *Enterococcus faecalis* в развитии пиелонефрита у детей // Тихоокеанский медицинский журнал. 2017.

- № 2 (68). С. 58–61. [Zaitseva E.A., Krukovich E.V., Melnikova E.A., Luchaninova V.N., Komenkova T.S., Vaysero N.S. The role of pathogenicity factors of *Enterococcus faecalis* in the development of pyelonephritis in children. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2017, no. 2 (68), pp. 58–60. (In Russ.)] doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.2.58-61
5. Леженко Г.А., Пашкова Е.Е., Петрашина Е.Н., Рудова Е.И. Исследование бактериального спектра возбудителей инфекции мочевыделительной системы как залог рациональной антибактериальной терапии у детей // Здоровье ребенка. 2016. № 7 (75). С. 35–40. [Lezhenko G.O., Pashkova O.Ye., Petrashina O.M., Rudova O.I. Investigation of bacterial spectrum of the agents of urinary tract infections in children as a key to rational antibacterial therapy. *Zdorov'e rebenka = Child Health*, 2016, vol. 7, no. 75, pp. 35–40. (In Russ.)] doi: 10.22141/2224-0551.7.75.2016.86721
 6. Лойман Э., Цыгин А.Н., Саркисян А.А. Детская нефрология: практическое руководство. М.: Литтерра, 2010. 400 с. [Loiman E., Cygin A.N., Sarkisyan A.A. *Pediatric nephrology: a practical guide*. Moscow: Litterra, 2010. 400 p. (In Russ.)]
 7. Мельникова Е.А., Зайцева Е.А., Лучанинова В.Н., Крукович Е.В., Горелик Н.В., Семешина О.В., Коменкова Т.С. Применение модифицированного способа определения лейкоцитарного индекса эндогенной интоксикации у детей с инфекцией мочевой системы // Врач. 2017. № 11. С. 83–84. [Melnikova E.A., Zaitseva E.A., Luchaninova V.N., Krukovich E.V., Gorelik N.V., Semeshina O.V., Komenkova T.S. Use of a modified procedure for determining the leukocyte index of endogenous intoxication in children with urinary tract infection. *Vrach = The Doctor*, 2017, no. 11, pp. 83–84. (In Russ.)]
 8. Мельникова Е.А., Лучанинова В.Н., Зайцева Е.А., Семешина О.В. Структура и антибиотикорезистентность уропатогенов, выделенных у новорожденных с инфекцией мочевых путей // Практическая медицина. 2015. Т. 2, № 2 (87). С. 97–100. [Melnikova E.A., Luchaninova V.N., Zaitseva E.A., Semeshina O.V. The structure and antibiotic resistance of uropathogens of discharges from infants with urinary tract infection. *Prakticheskaya medicina = Practical Medicine*, 2015, vol. 2, no. 2 (87), pp. 97–100. (In Russ.)]
 9. Скепьян Е.Н., Василевский И.В., Топтун П.Д. Анализ спектра возбудителей инфекции мочевыводящих путей и характеристика их чувствительности к противомикробным лекарственным средствам у детей на амбулаторном этапе // Медицинская панорама. 2013. № 8. С. 35–38. [Skeypyan E.N., Vasilevski I.V., Toptun P.D. Analysis of the spectrum of infections of the urinary tract and the characteristic their sensitivity to antimicrobial drugs the children's outpatient. *Meditsinskaya panorama = Medical Panorama*, 2013, no. 8, pp. 35–38. (In Russ.)]
 10. Чашина И.Л., Таточенко В.К., Баркадзе М.Д. Место цефалоспоринов в терапии инфекций мочевыводящих путей у детей // Вопросы современной педиатрии. 2012. Т. 11, № 1. С. 158–161. [Chashhina I.L., Tatochenko V.K., Barkadze M.D. The role of cephalosporins in urinary tract infections treatment in children. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Questions of Modern Pediatrics*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 158–161. (In Russ.)]
 11. Чугунова О.Л., Шумихина М.В., Думова С.В. Современные представления об инфекции мочевой системы у новорожденных и детей раннего возраста // Эффективная фармакотерапия. 2013. № 42. С. 38–47. [Chugunova O.L., Shumikhina M.V., Dumova S.V. Current overview of the urinary system infection in newborns and infants. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2013, no. 42, pp. 38–47. (In Russ.)]
 12. Horsley H., Malone-Lee J., Holland D., Tuz M., Hibbert A., Kelsey M., Kupelian A., Rohn J.L. *Enterococcus faecalis* subverts and invades the host urotelium in patients with chronic urinary tract infection. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12: e83637. doi: 10.1371/journal.pone.0083637
 13. Kaufman J., Templ-Smith M., Sancil L. Urinary tract infection in children: an overview of diagnosis and management. *BMJ Paediatrics Open*, 2019, no. 3: e000487. doi: 10.1136/bmjpo-2019-000487
 14. Lai H.C., Chang S.N., Lin H.C., Hsu Y.L., Wei H.M., Kuo C.C., Hwang K.P., Chiang H.Y. Association between urine pH and common uropathogens in children with urinary tract infections. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2019, 9 p. doi: 10.1016/j.jmii.2019.08.002
 15. Walawender L., Hains D.S., Schwaderer A.L. Diagnosis and imaging of neonatal UTIs. *Pediatr. Neonatol.*, 2020, vol. 61, no. 2, pp. 195–200. doi: 10.1016/j.pedneo.2019.10.003

Авторы:

Зайцева Е.А., д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета, г. Владивосток, Россия;

Лучанинова В.Н., д.м.н., профессор кафедры педиатрии и детской кардиологии, Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Мельникова Е.А., к.м.н., зав. краевым детским уронефрологическим центром Краевой детской клинической больницы №1, г. Владивосток, Россия;

Коменкова Т.С., аспирант, центральная научно-исследовательская лаборатория, Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;

Крукович Е.В., д.м.н., профессор института педиатрии, Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Zaitseva E.A., PhD MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Luchaninova V.N., PhD MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Cardiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Melnikova E.A., PhD (Medicine), Head of the Regional Children's Urology Center, Children's Clinical Hospital No. 1, Vladivostok, Russian Federation;

Komenkova T.S., PhD Student, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Krukovich E.V., PhD MD (Medicine), Professor, Pediatric Institute, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ В ЭПИДСЕЗОН 2018–2019 гг.

Л.В. Волощук¹, А.А. Го¹, М.М. Писарева², Д.А. Гужов², М.А. Бичурин¹,
П.А. Петрова^{1,2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Несмотря на успехи профилактики и терапии, грипп остается массовым заболеванием с показателем смертности в мире 0,01–0,2%. **Цель.** Проведение клинико-лабораторного анализа случаев гриппозной инфекции и определение роли отдельных серотипов вируса гриппа и других респираторных вирусов в заболеваемости гриппом и ОРВИ в эпидемический сезон 2018–2019 гг. у взрослых госпитализированных больных. **Материалы и методы.** Проанализировано 569 историй болезни пациентов, находившихся на стационарном лечении в Клинической инфекционной больнице им. С.П. Боткина. При обследовании методом ПЦР у 260 человек лабораторно подтвержден грипп. Вирусологическим методом на культуре клеток MDCK исследованы назофарингеальные смывы от 36 пациентов. Выделено и идентифицировано 24 штамма вируса гриппа. **Результаты.** Методом ПЦР у больных были выделены вирусы гриппа А в 98,5%, вирусы гриппа В — в 1,5%. Среди выделенных на культуре клеток вирусов гриппа в 50% случаев были идентифицированы вирусы гриппа серотипа А(Н1N1), близкородственные пандемическому варианту вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. Часть изолятов (41,7%) относились к серотипу А(Н3N2) и были родственны штамму А/Сингапур/16-0019/16. Штамм вируса гриппа В викторианской линии, выделенный от госпитализированного больного, имел тройную делецию в гемагглютинине и по антигенным свойствам существенно отличался от штамма вируса гриппа, входящего в состав современных гриппозных вакцин. При поступлении состояние больных расценивалось как среднетяжелое. Среди наблюдаемых больных 48,7% составляли мужчины, 51,3% — женщины. Медиана возраста — 35 лет. В половине случаев регистрировались сопутствующие заболевания. Клиническая картина гриппа в сезон 2018–2019 гг. была такой же, как и в предыдущие эпидемические сезоны. Продолжительность интоксикационного синдрома составляла $4,5 \pm 0,13$ дня, катарального — $6,9 \pm 0,29$ дня при медиане температуры тела $39,2 \pm 0,06$ °C. Все больные получали стандартную патогенетическую терапию. У 86,7% пациентов отмечались осложнения: у 11,1% — пневмония, у 6,9% — синусит и у 56,9% — бронхит. Койко-день составил $5,93 \pm 0,29$ дня. Летальных случаев зарегистрировано не было. **Заключение.** У наблюдаемых больных преобладали вирусы гриппа А, вирус гриппа В отмечался лишь в 1,5% случаев. Клиническая картина характеризовалась выраженным интоксикационным и катаральным синдромом, частым развитием осложнений.

Ключевые слова: грипп, вирусы гриппа, эпидемиология, клиническая картина, осложнения, пневмония.

Адрес для переписки:

Волощук Любовь Васильевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (921) 797-07-47 (моб.).
E-mail: 7970747@mail.ru

Contacts:

Liubov V. Voloshchuk
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 797-07-47 (mobile).
E-mail: 7970747@mail.ru

Для цитирования:

Волощук Л.В., Го А.А., Писарева М.М., Гужов Д.А., Бичурин М.А.,
Петрова П.А. Клинико-лабораторная характеристика гриппозной
инфекции у госпитализированных взрослых больных в эпидсезон
2018–2019 гг. // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 191–196.
doi: 10.15789/2220-7619-CAL-1467

Citation:

Voloshchuk L.V., Go A.A., Pisareva M.M., Guzhov D.A., Bichurina M.A.,
Petrova P.A. Clinical and laboratory characteristics of influenza infection
in hospitalized adult patients during the 2018–2019 epidemic season //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,
vol. 11, no. 1, pp. 191–196. doi: 10.15789/2220-7619-CAL-1467

CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF INFLUENZA INFECTION IN HOSPITALIZED ADULT PATIENTS DURING THE 2018–2019 EPIDEMIC SEASON

Voloshchuk L.V.^a, Go A.A.^a, Pisareva M.M.^b, Guzhov D.A.^b, Bichurina M.A.^a, Petrova P.A.^{a,b}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Despite the success in prevention and therapy, influenza remains a mass disease with mortality rate up to 0.01–0.2% worldwide. *Purpose.* Conducting clinical and laboratory analysis of influenza infection cases and evaluating their etiological significance in adult hospitalized patients during 2018–2019 epidemic season. *Materials and methods.* There were analyzed 569 case histories of patients hospitalized at the Clinical Infectious Diseases Hospital named after S.P. Botkin. Patients were examined by PCR that resulted in verified influenza virus in 260 cases. Nasopharyngeal swabs collected from 36 patients were examined by virological method on MDCK cell culture. 24 influenza virus strains were isolated and identified. *Results.* The study allowed to identify a viral landscape represented by influenza viruses A and B found in 98.5% and 1.5% cases, respectively. Influenza viruses isolated on cell culture in 50% of cases were identified. Among the influenza viruses isolated on cell culture there were identified serotype A influenza viruses (H1N1) closely related to the pandemic influenza A (H1N1)pdm09. Some isolates (41.7%) belonged to serotype A (H3N2), which were related to strain A/Singapore/16-0019/16. Influenza B virus strain of the Victoria lineage isolated from a hospitalized patient possessed a triple deletion in hemagglutinin gene, which antigenic properties substantially differed from those of the influenza virus strain being included into current influenza vaccines. Upon admission, the condition of most patients was estimated as moderate (males — 48.7%, females — 51.3%). The median patient age was 35 years old, with comorbidities being registered in 50% cases. The clinical picture for 2018–2019 seasonal influenza displayed no distinctive features as compared to previous epidemic seasons. The duration of intoxication and catarrhal syndrome was 4.3 ± 0.13 and 6.9 ± 0.29 days, respectively, with median body temperature ranging within $39.2 \pm 0.06^\circ\text{C}$. All patients received standard pathogenetic therapy. Complications were noted in 86.7% cases such as pneumonia — 11.1%, sinusitis — 6.9%, bronchitis — 56.9%. The bed day length was 5.93 ± 0.29 , no lethal outcomes were recorded. *Conclusion.* It was found that influenza A viruses were dominant in patients observed comprising up to 98.5% cases, whereas influenza viruses B were found in as few as 1.5% patients. The clinical picture was characterized by severe intoxication and catarrhal syndrome, being frequently associated with complications.

Key words: influenza, influenza virus, epidemiology, clinical presentation, complications, pneumonia.

Введение

Несмотря на успехи в лечении инфекционной патологии, грипп до настоящего времени остается плохо контролируемой глобальной инфекцией, наносящей значительный социально-экономический ущерб [1, 4, 7, 8]. Поражение дыхательного эпителия при гриппе вызывает снижение врожденного иммунного контроля за пневмококками и развитие бактериальной пневмонии [10]. Имеются данные о неблагоприятном течении гриппа, особенно обусловленном новым вариантом возбудителя, у лиц с отягощенным преморбидным фоном: заболеваниями легких или сердечно-сосудистой системы, почек, сахарным диабетом, первичными и вторичными иммунодефицитами (при ВИЧ, онкопатологии, у лиц, получающих иммунодепрессанты, цитостатики, лучевую терапию, высокие дозы кортикостероидов или ацетилсалициловую кислоту), а также при беременности [2, 3, 9, 14]. Этому способствуют внутрисосудистые микроциркуляторные нарушения, вызванные гриппом, повышенная агрегация тромбоцитов и активность факторов свертываемости крови, повышение сосудистой проницаемости [5]. В результате специфических и токсических воз-

действий при гриппе повреждаются респираторный эпителий и микроциркуляторное русло, соединительнотканые элементы легких, что ведет к стремительному развитию острого респираторного дистресс-синдрома, а также других внутренних органов, вследствие чего возникают параспецифические поражения [11, 13].

Появились сообщения о способности вирусов поражать инсулярный аппарат поджелудочной железы. Такое действие гриппозного вируса связывают с явлением молекулярной мимикрии, обусловленной общими антигенными детерминантами вирусных белков и мембранных белков клеток островков Лангерганса. У каждого второго больного сахарным диабетом во время гриппа и ОРЗ развивалась декомпенсация.

Показатели смертности от гриппа в мире обычно составляют 0,01–0,2%, значительно увеличиваясь среди детей до 2 лет и лиц старше 65 лет и при развитии пневмонии, осложняющей основное течение заболевания [12]. Следует учитывать также концепцию отложенной смерти при гриппе [6]. По данным ВОЗ, грипп занимает первое место и среди причин смерти от вирусных инфекций [7].

Таким образом, учитывая старение населения и увеличение трудоспособного возраста,

возрастает значение гриппа не только как тяжелого инфекционного заболевания, но и как социально значимой инфекции.

Цель настоящего исследования — анализ случаев гриппозной инфекции и оценка этиологического фактора в эпидемический сезон 2018–2019 гг. у взрослых больных, госпитализированных в Клиническую инфекционную больницу (КИБ) им. С.П. Боткина. Задачами исследования являлись оценка клинической картины гриппозной инфекции, особенностей изменения лабораторных показателей; определение вклада отдельных серотипов вируса гриппа и других респираторных вирусов в заболеваемость гриппом и ОРВИ в эпидемический сезон 2018–2019 гг. у больных, госпитализированных в КИБ им. С.П. Боткина.

Материалы и методы

Ретроспективно изучено 569 историй болезни госпитализированных взрослых больных с диагнозом острой респираторной вирусной инфекции. С целью изучения этиологической структуры заболевания в эпидемический сезон 2018–2019 у больных, госпитализированных в КИБ им. С.П. Боткина, осуществляли забор носоглоточных мазков с последующим исследованием на обнаружение генетического материала респираторных вирусов и выделением вирусов гриппа на культуре клеток. Носоглоточные мазки собирали в пробирки, содержащие 3 мл универсальной транспортной среды для вирусов (транспортные системы СОРАН, Италия). Взятие образцов проводилось в первые сутки госпитализации, но не позднее 7-го дня заболевания.

Экстракцию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей проводили с применением набора «РИБО-преп», реакцию обратной транскрипции — с помощью набора «Реверта-Л». Для выявления НК вирусов гриппа А и В и ОРВИ использовали тест-системы «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборах Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Изоляцию вирусов гриппа проводили из клинического материала на культуре клеток МДСК в соответствии с рекомендациями. Типирование изолятов выполняли в реакции торможения гемагглютинации по общепринятой методике с диагностическими сыворотками к эталонным и эпидемическим штаммам виру-

са гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н1N1), А(Н3N2) и В двух линий: ямагатской и викторианской.

Клинические методы: ежедневный осмотр больных с оценкой и регистрацией в формализованной истории болезни всех клинических симптомов, данных осмотра врачей-специалистов, а также результатов лабораторных и инструментальных исследований пациентов.

Инструментальные методы: рентгенография органов грудной клетки осуществлялась однократно в двух проекциях при неосложненном течении гриппа и двукратно с интервалом в 10–14 дней — при наличии пневмонии. Электрокардиография проводилась по показаниям.

Лабораторные клинические исследования: клинический анализ крови, общий анализ мочи и определение биохимических показателей (сахар крови, АЛТ, креатинин) выполнялись общепринятыми методами.

Анализ полученных результатов проводился с применением статистического пакета SPSS Statistics 17.0.

Результаты и обсуждение

В конце 2018 г. первые случаи гриппа, вызванного вирусом гриппа А(Н3N2), у госпитализированных больных зафиксированы на 49 неделе, с 52 недели выявлялись случаи заболевания как вирусами гриппа А(Н3N2), так и вирусами гриппа А(Н1N1). Максимальное число зарегистрированных случаев гриппа пришлось на 3 неделю 2019 г. (рис. 1). С целью изучения этиологической структуры заболевания у больных, госпитализированных в КИБ им. С.П. Боткина, проанализированы истории болезни и осуществлен забор носоглоточных мазков с последующим исследованием генетического материала респираторных вирусов. Всего было исследовано 569 образцов, из них с положительным результатом 312, то есть 52,0%. Среди детектированных вирусов преобладали вирусы гриппа, что составило 83,7% (260 положительных проб).

Как и в 2017–2018 гг., в этот эпидемический сезон преобладали вирусы гриппа А(Н3N2), частота обнаружения которых составила 47,7%, на втором месте по выявляемости был вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 — 32,1%, в единичных случаях были выявлены вирусы гриппа А не типизируемые и вирусы гриппа В. Прочие респираторные вирусы (адено-, РС-, коронавирусы, вирусы парагриппа, микоплазма пневмонии) были обнаружены в незначительном проценте случаев (рис. 2).

При вирусологическом исследовании назофарингеальных смывов от 36 больных, у которых была обнаружена РНК вируса гриппа, было выделено 24 штамма вируса гриппа. В 50%

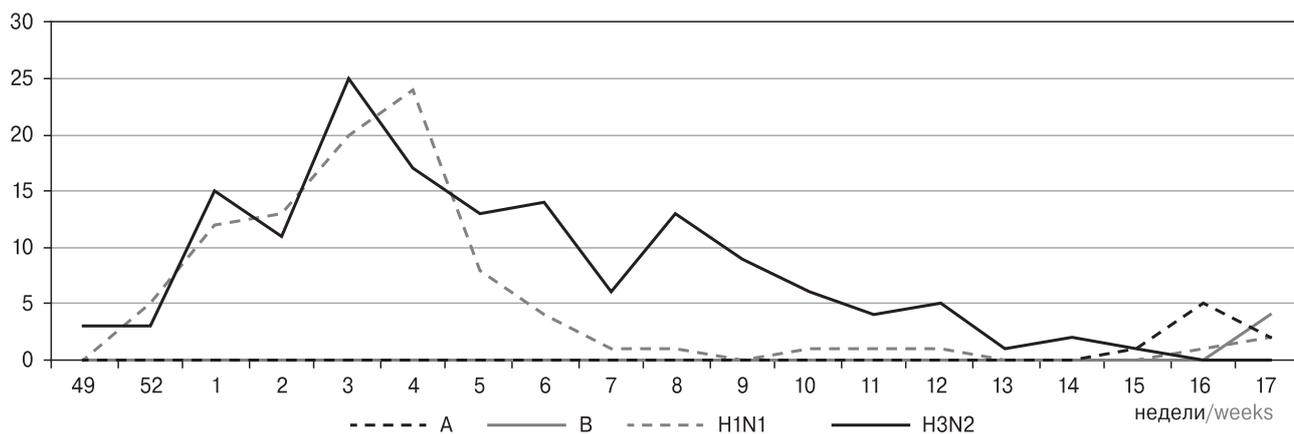


Рисунок 1. Регистрация гриппа по неделям у больных, госпитализированных в КИБ им. С.П. Боткина
Figure 1. Influenza registration by week in patients hospitalized at the Botkin Clinical Hospital

случаев были идентифицированы вирусы гриппа серотипа А(Н1N1), которые были близкородственны пандемическому варианту вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 и вакцинному штамму А/Мичиган/45/15. Часть изолятов (41,7%) относились к серотипу А(Н3N2) и были родственны штамму А/Сингапур/16-0019/16. От госпитализированных больных в эпидемический сезон был выделен один вирус гриппа В викторианской линии. Выделенный штамм вируса гриппа В/СПб/22/19 реагировал до $1/16$ гомологичного титра с крысиной антисывороткой, полученной к вакцинному штамму вируса гриппа В/Колорадо/06/17. Выделенный в 2019 г. штамм вируса гриппа В имел тройную делецию 162–164 в гемагглютинине и относился к другой антигенной группе вирусов, которые ранее не циркулировали в России. Штамм вируса гриппа

В/СПб/22/19 по антигенным свойствам существенно отличался от штамма вируса гриппа, входящего в состав современной инактивированной гриппозной вакцины.

Проведенный ретроспективный анализ 256 историй болезни пациентов, госпитализированных на отделение КИБ им. С.П. Боткина с лабораторно подтвержденным диагнозом «грипп», дал следующие результаты. Среди наблюдаемых больных незначительно преобладали лица женского пола — 51,3%, а количество мужчин составило 48,7%. Медиана возраста составила 35 лет. Минимальное значение — 17 лет, максимальное — 90 лет, средний возраст мужчин и женщин был примерно одинаковым — 41,9 и 40,6 лет соответственно. Сопутствующая патология имела у 55,6% больных, наиболее часто регистрировались заболевания сердечно-сосудистой системы, сочетанная патология, патология со стороны ЛОР-органов и желудочно-кишечного тракта. Без сопутствующей патологии оказалось 44,4% пациентов. Среди госпитализированных больных было 25,0% курящих и 4,2% употребляющих алкоголь. Количество вакцинированных от гриппа пациентов составило 6,9%, точное название вакцины и дату вакцинации заболевшие указать не смогли.

Большинство больных поступало на ранних сроках от начала заболевания, среднее значение составило $2,99 \pm 0,10$ дня. Оценивая тяжесть заболевания, необходимо отметить, что все пациенты, находившиеся под наблюдением, переносили заболевание средней степени тяжести. Клиническая картина гриппа в сезон 2018–2019 не имела каких-либо отличительных особенностей по сравнению с картиной в прежние эпидемические сезоны. У госпитализированных больных были зафиксированы выраженный катаральный и интоксикационный синдромы. У 90,3% больных отмечалась цефалгия, в 100% случаев беспокоила слабость.

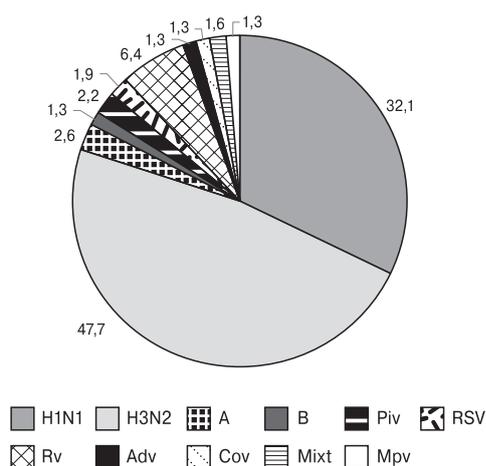


Рисунок 2. Этиология ОРВИ у госпитализированных больных в эпидемический сезон 2018–2019

Figure 2. Etiology of acute respiratory infections in hospitalized patients during the 2018–2019 epidemic season

Продолжительность интоксикации в среднем оказалась $4,5 \pm 0,13$ дня, подъем температуры у некоторых больных достигал $40,0^\circ\text{C}$, в среднем составил $39,2 \pm 0,06^\circ\text{C}$. Практически всех больных беспокоил кашель — 95,8%, одышка регистрировалась в 2,8% случаев. В среднем продолжительность катарального синдрома составляла $6,9 \pm 0,29$ дня. Продолжительность госпитализации составила $5,93 \pm 0,29$ койко-дней. Из особенностей клинической картины можно отметить наличие у больных микрогематурии (26,4%). Ведущим осложнением при гриппе в сезон 2018–2019 был острый бронхит — 56,9%, вторым по значимости была пневмония — 11,1%, течение без осложнений наблюдалось у 15,3% больных. Летальных исходов зарегистрировано не было (рис. 3).

В последние годы начало циркуляции вирусов гриппа приходилось на конец осени — начало зимы с пиком в январе–феврале. В отдельные эпидемические сезоны регистрировались вторые пики заболеваемости гриппом, связанные со сменой доминирующего вируса [1]. Мониторинг респираторных вирусов позволил установить, что эпидемический процесс гриппа и прочих ОРВИ в сезон 2018–2019 в Санкт-Петербурге имел свои особенности. Следует отметить более ранний пик заболеваемости, который пришелся на 3 неделю регистрации, без повторных подъемов. Также необходимо отметить, что заболеваемость в основном была обусловлена вирусами гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2), и лишь в единичных случаях вирусом гриппа В. Выделенный штамм вируса гриппа В по антигенным свойствам значительно отличался от вакцинального штамма. Клиническая картина в целом не отличалась от типичной. Ведущим осложнением при гриппе, как и в предыдущие сезоны, являлся бронхит, а вторым по частоте была пневмония, что не отличается от литературных данных [10].

Список литературы/References

1. Башкетова Н.С., Чхинджерия И.Г., Бичурина М.А., Крайнова Т.И., Брянцева Е.А., Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Дегтярев О.В., Демакова Т.Е. Эпидемический подъем заболеваемости гриппом в Санкт-Петербурге в 2016 году // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 303–308. [Bashketova N.S., Chkhindzheriya I.G., Bichurina M.A., Krainova T.I., Bryanceva E.A., Lavrentyeva I.N., Suhobaevskaya L.P., Degtjarev O.V., Demakova T.E. Epidemic rise in the incidence of influenza in St. Petersburg in 2016. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 303–308. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-303-308
2. Гладков С.А., Григорьева И.В., Дедов В.А., Эсауленко Е.В., Цинзерлинг В.А. Клинико-морфологические сопоставления в случаях летальных исходов при гриппе в 2009–2011 гг. // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 4. С. 55–61. [Gladkov S.A., Grigorieva I.V., Dedov V.A., Esaulenko E.V., Zinserling V.A. Clinicopathologic analysis of lethal influenza cases in 2009–2011. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 55–61. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2011-3-4-55-61
3. Еженедельный бюллетень по информированному мониторингу проявлений гриппа H1N1 и других генотипов вируса с пандемическим потенциалом за период 09.05.2010–16.06.2010 / ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». № 7. [Weekly newsletter on informed monitoring of the manifestations of H1N1 influenza and other genotypes of the virus with pandemic potential for the period 09.05.2010–16.06.2010 / State Research Institute of Virology and Biotechnology “Vector”. No. 7. (In Russ.)] URL: fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/h1n1flu/files/vector-inf-bull-2010-7.pdf (10.01.2021)

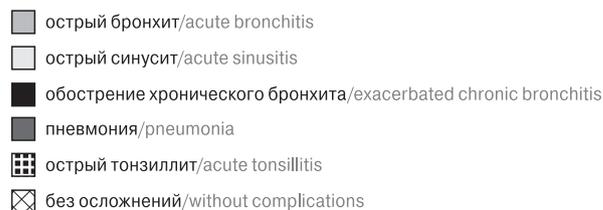
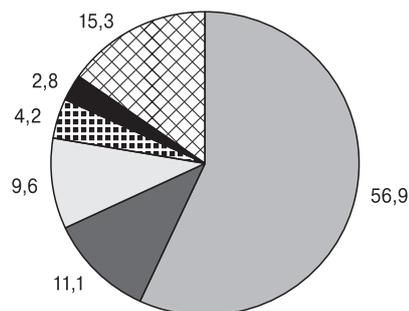


Рисунок 3. Осложнения у больных с диагнозом «грипп»

Figure 3. Complications in patients diagnosed with influenza

Выводы

Особенностями эпидемического подъема гриппа и ОРВИ в 2018–2019 гг. являлись:

- ранний по сравнению с предыдущими сезонами пик заболеваемости гриппом и ОРВИ на третьей неделе 2019 г.;
- значительное преобладание вирусов гриппа (83,7%) среди прочих респираторных вирусов;
- низкая частота выделения вирусов гриппа В от госпитализированных больных;
- клиническая картина гриппа характеризовалась выраженными интоксикационным и катаральным синдромами, частым осложненным течением заболевания (84,7%, включая 11,1% пневмоний). Летальные исходы не были зарегистрированы.

4. Жаркин Н.А., Подобед Н.Д. Грипп и вызванная им пневмония у беременных: уроки пандемии // Журнал практического врача акушера-гинеколога. 2010. № 1. С. 11–15. [Zharkin N.A., Podobed N.D. Influenza and the pneumonia caused by it in pregnant women: lessons from a pandemic. *Zhurnal prakticheskogo vracha akushera-ginekologa = Journal of the Practical Obstetrician-Gynecologist*, 2010, no. 1, pp. 11–15. (In Russ.)]
5. Манухина Е.Б., Лямина Н.П., Долотовская П.В., Машина С.Ю., Лямина С.В., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю. Роль оксида азота и кислородных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии // Кардиология. 2002. Т. 42, № 11. С. 73–84. [Manukhina E.B., Lyamina N.P., Dolotovskaya P.V., Machina S.Yu., Lyamina S.V., Pokidyshev D.A., Malyshev I.Yu. The role of nitric oxide and oxygen radicals in the pathogenesis of arterial hypertension. *Kardiologiya = Cardiology*, 2002, vol. 42, no. 11, pp. 73–84. (In Russ.)]
6. Покровский В.И., Семенов Б.Ф. Концепция отложенной смерти при гриппе и тактика вакцинопрофилактики инфарктов, инсультов и летальных исходов при этой инфекции // Русский медицинский журнал. 2003. Т. 11, № 22. С. 1266–1268. [Pokrovsky V.I., Semenov B.F. The concept of delayed death in influenza and the tactics of vaccine prophylaxis of heart attacks, strokes and deaths with this infection. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2003, vol. 11, no. 22, pp. 1266–1268. (In Russ.)]
7. Шаханина И.Л. Экономический анализ инфекционных болезней: прошлое, настоящее, будущее // Инфекционные болезни. 2009. Т. 7, № 1. С. 16–19. [Shakhanina I.L. Economic analysis of infectious diseases: past, present, future. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2009, vol. 7, no. 1, pp. 16–19. (In Russ.)]
8. Dawood F.S. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.*, 2009, vol. 360, no. 25, pp. 2605–2615. doi: 10.1056/NEJMoa0903810
9. Freeman D.W., Barno A. Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1959, vol. 78, no. 6, pp. 1172–1175. doi: 10.1016/0002-9378(59)90570-8
10. Garnacho-Montero J., León-Moya C., Gutiérrez-Pizarraya A., Arenzana-Seisdedos A. Vidaur L., Guerrero J.E., Gordón M., Martín-Loeches I., Rodríguez A.; on Behalf GETGAG Study Group. Clinical characteristics, evolution, and treatment-related risk factors for mortality among immunosuppressed patients with influenza A (H1N1) virus admitted to the intensive care unit. *J. Crit. Care*, 2018, vol. 48, pp. 172–177. doi: 10.1016/j.jcrc.2018.08.017
11. Jochems S.P., Marcon F., Carniel B.F., Holloway M., Mitsi E., Smith E., Gritzfeld J.F., Solórzano C., Reiné J., Pojar S., Nikolaou E., German E.L., Hyder-Wright A., Hill H., Hales C., de Steenhuijsen Piter W.A.A., Bogaert D., Adler H., Zaidi S., Connor V., Gordon S.B., Rylance J., Nakaya H.I., Ferreira D.M. Inflammation induced by influenza virus impairs human innate immune control of pneumococcus. *Nat. Immunol.*, 2018, vol. 19, no. 12, pp. 1299–1308. doi: 10.1038/s41590-018-0231-y
12. Kao K.C., Chang K.W., Chan M.C., Liang S.J., Chien Y.C., Hu H.C., Chiu L.C., Chen W.C., Fang W.F., Chen Y.M., Sheu C.C., Tsai M.J., Perng W.C., Peng C.K., Wu C.L., Wang H.C., Yang K.Y. Predictors of survival in patients with influenza pneumonia-related severe acute respiratory distress syndrome treated with prone positioning. *Ann. Intensive Care*, 2018, vol. 8, no. 94, pp. 1–9. doi: 10.1186/s13613-018-0440-4
13. Longini I.M. Jr., Halloran M.E., Nizam A., Yang Y. Containing pandemic influenza with antiviral agents. *Am. J. Epidemiol.*, 2004, vol. 159, no. 7, pp. 623–633. doi: 10.1093/aje/kwh092
14. Smeeth L., Cook C., Thomas S., Hall A.J., Hubbard R., Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet*, 2006, vol. 367, no. 9516, pp. 1075–1079. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68474-2

Авторы:

Волощук Л.В., к.м.н., старший научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Го А.А., к.м.н. врач-инфекционист, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Гужов Д.А., аспирант ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;

Писарева М.М., к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;

Бичурина М.А., д.м.н., зав. вирусологической лабораторией Центра по элиминации кори и краснухи, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Петрова П.А., научный сотрудник ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Voloshchuk L.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Go A.A., PhD (Medicine), infectologist, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Guzhov D.A., PhD Student, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Pisareva M.M., PhD (Medicine), Leading Researcher, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Virological Laboratory of Measles and Rubella Elimination, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Petrova P.A., Researcher, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

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. Appleton & 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, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
 Каталог «Роспечать» — индекс 95001;
 Объединенный каталог «Пресса России» и электронный каталог «Российская периодика»
 в сети Internet на сайте www.agrk.org — индекс 41392.
 Цена свободная.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Айкимбаев А.М.	137	Жирков А.А.	111	Петрова П.А.	191
Алексеева Л.А.	111	Зайцева Е.А.	184	Писарева М.М.	191
Антипова А.Ю.	171	Захаров К.С.	165	Рамазанова З.К.	157
Ахматова Н.К.	85	Зверева Н.Н.	157	Романенкова Н.И.	17
Ахматова Э.А.	85	Каливоги С.	165	Сактаганов Н.Т.	137
Базарова М.В.	157	Калиниченко Е.О.	85	Самков А.А.	157
Базыкина Е.А.	148	Кальгина Г.А.	177	Самодова О.В.	131
Баймухаметова А.М.	137	Карташов М.Ю.	165	Саньчиков Д.В.	93
Бакштановская И.В.	177	Кирдяшова С.Е.	148	Саркисян Н.С.	9
Балахонцева Л.А.	148	Кливлеева Н.Г.	137	Сафронов В.А.	165
Банцевич М.Д.	171	Коменкова Т.С.	184	Саятов М.Х.	137
Барышникова Н.В.	68	Константинов О.К.	165	Сварваль А.В.	68
Бельды В.Н.	148	Косырева А.Н.	177	Скрипченко Н.В.	111
Белявская В.А.	123	Котелева С.И.	157	Степанова К.Б.	177
Березин В.Э.	137	Котова В.О.	148	Степанова Т.Ф.	177
Бессонова Т.В.	111	Кригер Е.А.	131	Столпникова В.Н.	85
Бичурина М.А.	17, 171, 191	Крукович Е.В.	184	Суворов А.Н.	68
Бишева И.А.	85	Кубарь О.И.	17	Сходова С.А.	85
Бляхер М.С.	157	Кукина О.М.	85	Титова Л.В.	131
Бойко А.В.	165	Кукушкина Е.А.	157	Троценко О.Е.	148
Буаро М.И.	165	Куличенко А.Н.	9	Успенский Ю.П.	68
Бумбали С.	165	Курлаева Л.В.	177	Федорова И.М.	157
Вакуленко Ю.А.	42	Кутырев В.В.	165	Филипович-Вигньевич С.Б.	171
Волощук Л.В.	191	Лаврентьева И.Н.	171	Чижова А.В.	93
Габдрахманова А.Р.	93	Лукашев А.Н.	42	Шекин В.С.	93
Гарафутдинов Р.Р.	93	Лукманова Г.В.	137	Щербакова С.А.	165
Гинько З.И.	123	Лучанинова В.Н.	184	Varova N.K.	101
Глазутдинова Л.Р.	93	Мавзютов А.Р.	93	Chudilova G.A.	101
Глебова Т.И.	137	Магассуба Н'Ф.	165	Kudryavtseva T.A.	79
Го А.А.	191	Макаренкова И.Д.	85	Lantseva K.S.	57
Григорьева С.А.	177	Мезенцева Е.А.	25	Nesterova I.V.	101
Груббер И.М.	85	Мельникова Е.А.	184	Pavlenko V.N.	101
Гужов Д.А.	191	Монахова Н.Е.	111	Rusinova T.V.	101
Девяткин А.А.	42	Найденова Е.В.	165	Smirnov V.S.	79
Долгушин И.И.	25	Нассер А.	165	Tarakanov V.A.	101
Драме Ф.	165	Новосад Е.В.	157	Volobueva A.S.	57
Ермилова О.С.	123	Нусупбаева Г.Е.	137	Yutskevich Ya.A.	101
Железникова Г.Ф.	111	Онгарбаева Н.С.	137	Zarubaev V.V.	57

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аналитическая чувствительность	9	интерфероновый статус	157	ротавирус	25
антитела	131	интерферонотерапия	157	серозный менингит	111
антитела класса G	165	инфекционный мононуклеоз	157	серопревалентность	131
байесовская филогенетика	42	инфекция мочевой системы	184	социальная этика	17
бактериальный гнойный менингит	111	кишечник	25	субтип	148
беременные	131	клиническая картина	191	триггер	68
биологические свойства	184	клинические симптомы	184	филогенетический анализ	148
болезнь Крона	68	кожа	25	хронический гепатит С	148
вакцинальные реакции	123	коклюш	131	хронический описторхоз	177
вакцинация	131	коллективный иммунитет	171	цереброспинальная жидкость	111
вирус	171	компьютерная томография	9	экспериментальные	
вирус SARS-CoV-2	9	корь	171	белоксодержащие препараты	85
вирус гепатита С	148	краснуха	171	эпидемиология	191
вирус гриппа А(H1N1)pdm09	137	кровь	111	язвенный колит	68
вирус гриппа А(H3N2)	137	крысы	93	Aldara	79
вирус гриппа В	137	лабораторные показатели	184	antivirals	57
вирус осповакцины	123	легкие	25	В-лимфоциты	177
вирусные популяции	42	«Ликопид»	93	coinfection	101
вирусы гриппа	191	лимфоциты	111	COVID-19	9
вторичный иммунодефицит	93	липополисахариды	93	<i>Coxiella burnetii</i>	165
ВЭБ-инфекция у детей	157	лихорадка Ку	165	Coxsackievirus	57
Гвинейская Республика	165	миnorные субпопуляции	111	drug development	57
генетические полиморфизмы	177	модели эволюции	42	dsRNA	101
генотип	148	молекулярная эпидемиология	42	<i>E. faecalis</i>	184
гистология	93	морфологические характеристики	85	<i>E. meliloti</i>	93
глобальный конфликт интересов	17	нейтрализующие антитела	123	Enteroviruses	57
гомеостаз	25	нейтрофильные гранулоциты	25	experimental model	101
гражданская свобода	17	ОРВИ	137	fMLP	101
грипп	191	ортопоксвирусы	123	<i>Helicobacter pylori</i>	68
дендритные клетки	85	осложнения	191	HIV-infection	79
дети	111, 184	осложнения вакцинации	123	HPV clinical manifestations	79
диагностическая чувствительность	9	осповакцинация	123	human papillomavirus (HPV)	79
доверие	17	ответственность	17	IFN α	157
женский репродуктивный тракт	25	ОТ-ПЦР	9	IFN γ	157
жизненный цикл	25	пандемия COVID-19	17	imiquimod	79
защита общественного здоровья	17	персистенция	68	immunomodulation therapy	79
иммунизация	171	пневмококк	85	infection	57
иммунитет	131	пневмония	191	inhibitor	57
иммунная прослойка	165	популяционный иммунитет	137	myocarditis	57
иммунный ответ	68	ПЦР-диагностика	137	neutrophilic granulocytes	101
иммунный статус	177	расследование вспышек		phenotype	101
иммуноглобулины	177	инфекционных заболеваний	42	subpopulation	101
иммунофенотип	85	рекомбинантные формы	148	T-лимфоциты	177
иммунофенотипирование	111	рекомбинация	42	treatment methods	79
иммуноферментный анализ	165	репарация	25	Vartocid	79
индукция созревания	85	Республика Сербия	171		

Иллюстрации к статье «Морфометрическая характеристика эффектов фракций липополисахарида *Ensifer meliloti* на паренхиматозные органы лабораторных крыс с вторичным иммунодефицитом» (авторы: А.Р. Мавзютов, Л.Р. Глазутдинова, Д.В. Саньчиков, В.С. Щекин, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чижова, А.Р. Габдрахманова) (с. 93–100)

Illustrations for the article "Morphometric characteristics of effects induced by *Ensifer meliloti* lipopolysaccharide fractions on parenchymatous organs in laboratory rats with secondary immunodeficiency" (authors: Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shchekin V.S., Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R.) (pp. 93–100)

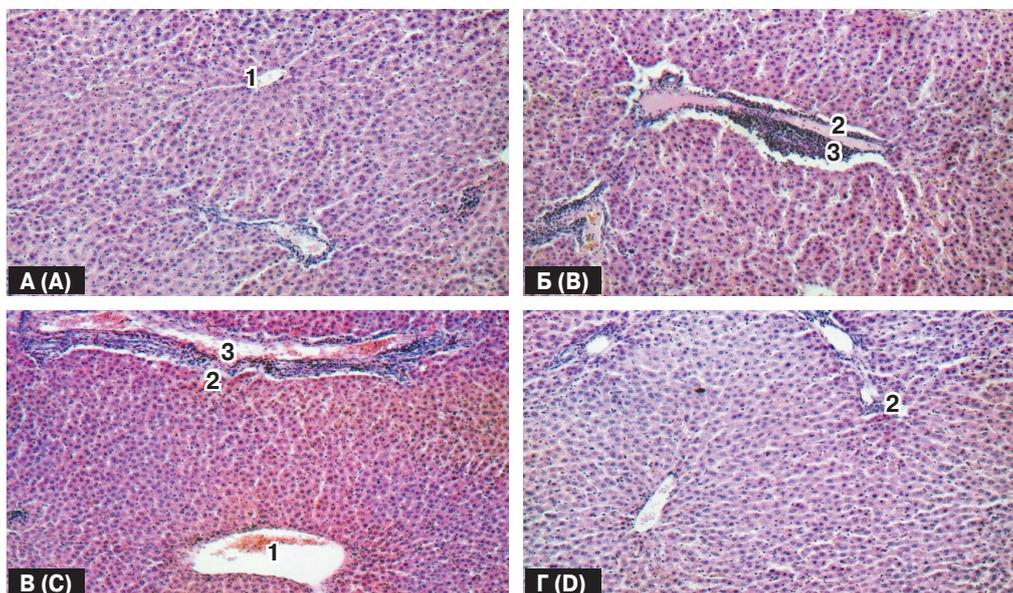


Рисунок 3. Гистологическая картина печени

Figure 3. The histological images of liver

A — контрольная группа, Б — группа иммунодефицит, В — группа «Ликопид», Г — группа ЛПС. 1 — центральная вена долек, 2 — порталный тракт, 3 — лимфоидный инфильтрат. Световая микроскопия. Увеличение $\times 100$.

Окраска: гематоксилин-эозин.

A — control group, B — immunodeficient group, C — Licopid group, D — LPS group. 1 — central vein of liver, 2 — portal area, 3 — lymphoid infiltration. Light microscopy. Objective magnification $\times 100$. Staining: HE.

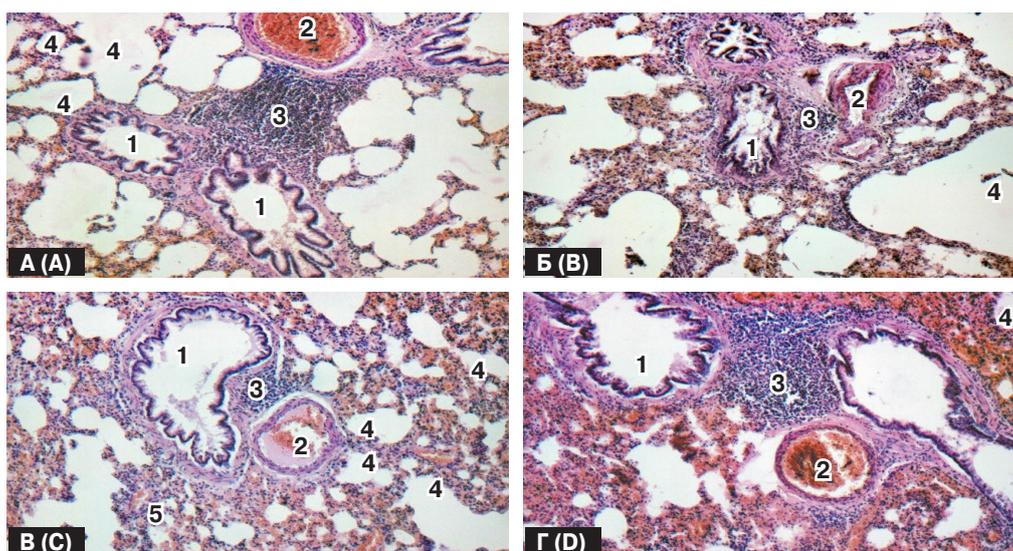


Рисунок 4. Гистологическая картина легких

Figure 4. The histological images of lungs

A — контрольная группа, Б — группа иммунодефицит, В — группа «Ликопид», Г — группа ЛПС. 1 — бронх, 2 — артерия, 3 — мантийная зона, 4 — альвеолы, 5 — межальвеолярные перегородки. Световая микроскопия. Увеличение $\times 100$.

Окраска: гематоксилин-эозин.

A — control group, B — immunodeficient group, C — Licopid group, D — LPS group. 1 — bronchus, 2 — arteria, 3 — mantle zone, 4 — alveoli, 5 — interalveolar septum. Light microscopy. Objective magnification $\times 100$. Staining: HE.

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

